

Untersuchungen zur Struktur von Biotinenzymen in Achromobacter

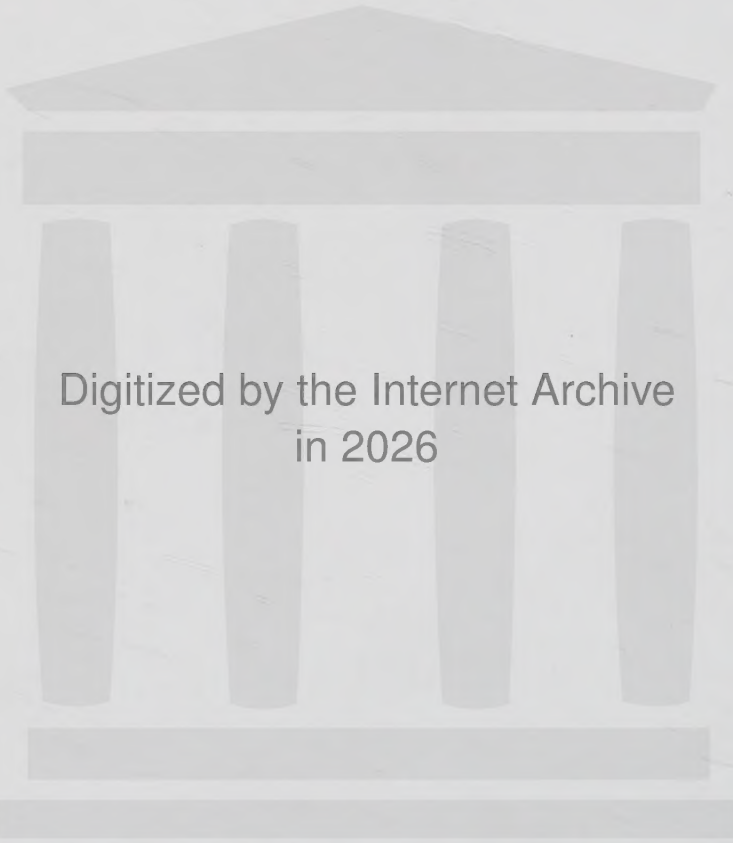
Isolierung und einige Eigenschaften eines
Biotin-Carboxylcarrier-Proteins aus Achromobacter

Dissoziation von β -Methylcrotonyl CoA-Carboxylase
und Reassoziaton der Untereinheiten zum aktiven Enzym

Abtrennung von Biotinpeptiden aus einem Peptidgemisch
durch Überföhrung des Biotins in das Sulfoniumsalz

Ulrich Schiele

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553809_0003

**Untersuchungen zur Struktur von Biotinenzymen
in Achromobacter**

Isolierung und einige Eigenschaften eines
Biotin-Carboxylcarrier-Proteins aus Achromobacter

Dissoziation von β -Methylcrotonyl CoA-Carboxylase
und Reassoziaton der Untereinheiten zum aktiven Enzym

Abtrennung von Biotinpeptiden aus einem Peptidgemisch
durch Überführung des Biotins in das Sulfoniumsalz

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von

Ulrich Schiele

München

1973



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Kühn

Tag der mündlichen Prüfung: 18.7.1973

Meiner lieben Mutter gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Lynen am Biochemischen Institut der Universität München und am Max Planck Institut für Zellchemie in der Zeit von März 1967 bis März 1973 ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. F. Lynen danke ich herzlich für das Interesse und die Unterstützung, die er meiner Arbeit und mir jederzeit zuteil werden ließ.

Von September bis Dezember 1969 hat mir Herr W. Straßhofer bei der Arbeit geholfen.

Ab Februar 1970 hat mich Fräulein R. Niedermeier sehr wirkungsvoll unterstützt. Für die sehr gute Mitarbeit möchte ich mich vielmals bedanken.

Meinem Bruder P. Schiele danke ich für das Zeichnen der Abbildungen.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Zur Züchtung von <i>Achromobacter</i> IVS	5
III. Biotin-haltige Proteine in <i>Achromobacter</i> IVS	9
IV. Isolierung und einige Eigenschaften eines Biotin-Carboxylcarrier-Proteins aus <i>Achromobacter</i> IVS	14
1. Die Anreicherung des Biotin-Carboxylcarrier-Proteins	14
2. Eigenschaften des Biotin-Carboxylcarrier-Proteins	21
3. Zusammenfassung	29
V. Dissoziation von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase und Reassozi- ation der Untereinheiten zum aktiven Enzym	30
1. Einleitung	30
2. Versuche zur Spaltung von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase in Untereinheiten	30
a) Spaltung in Harnstoff und Guanidin-Hydrochlorid	31
b) Spaltung durch Einfrieren und Auftauen in 0.5 M LiCl-Lösung	36
c) Spaltung in Ameisensäure	38
d) Spaltung in stark verdünnten Alkali-Salzlösungen im Neutralen und Alkalischen	40
e) Spaltung mit Natrium-Dodecylsulfat und Trimethylcetylammmonium-bromid	46
Bestimmung des Molekulargewichts der beiden Untereinheiten	46
3. Reassozi-ation der Untereinheiten von β -Methylcrotonyl-CoA- Carboxylase zum aktiven Enzym	52
4. Zusammenfassung und Diskussion	56
VI. Abtrennung von Biotinpeptiden aus einem Peptidgemisch durch Überführung des Biotins in das Sulfoniumsalz	60
1. Einleitung	60
2. Umsetzung von radioaktivem Biotin mit Jodacetamid	61
3. Umsetzung Biotin-haltiger Peptide mit Jodacetamid	62
4. Reinigung eines Peptids durch Nachspaltung	68

	Seite
5. Zusammenfassung und Diskussion	69
VII. Experimenteller Teil	71
1. Verwendete Geräte	71
2. Herkunft der verwendeten käuflichen Enzyme, Substrate und Chemikalien	72
3. Züchtung der Bakterien	73
4. Die Anreicherung der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase	79
a) Rohextrakt	79
b) Geladsorption	79
c) 1. Ammoniumsulfat-Fällung	80
d) 2. Ammoniumsulfat-Fällung	80
e) Einfrieren und Auftauen	80
f) Chromatographie an Sephadex G 200	80
g) Chromatographie an DEAE-Zellulose	81
5. Proteinbestimmung	81
6. Bestimmung der Enzymaktivität	81
7. Radioaktivitätsbestimmung mit dem Scintillationszähler	82
8. Darstellung von β -Methylcrotonyl-CoA	82
9. Darstellung von Acetyl-CoA	84
10. Herstellung des Calciumphosphat-Gels	84
zu IV. 11. Acetonfällung des Überstands der Geladsorption	84
12. Isoelektrische Fokussierung des Biotin- Carboxylcarrier-Proteins	84
zu IV. + V. 13. Gradientenlauf mit dem SW 40-Rotor	85
14. Abschätzung der Svedbergkonstanten	85
zu V. 15. Spaltungsversuche durch Dialyse gegen verdünnte Salzlösung mit kleineren Mengen von β -Methylcrotonyl- CoA-Carboxylase	86
16. Spaltung größerer Mengen von β -Methylcrotonyl-CoA- Carboxylase durch Membranfiltration mit verdünnten Alkali-Salzlösungen	87
17. Durchführung der Disk-Elektrophorese	88

III

	Seite
a) Disk-Elektrophorese in Natrium-Dodecylsulfat	88
b) Disk-Elektrophorese ohne Natrium-Dodecylsulfat	88
c) Färben und Entfärben der Gele	89
d) Bestimmung der Radioaktivität im Gel	89
18. Durchführung der Reassoziierung der Untereinheiten zur aktiven β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase	89
zu VI. 19. Elektrophoresen in der Michl-Elektrophorese- Apparatur	90
20. Messung der Radioaktivitätsverteilung mit dem Streifenzähler	90
21. Halbstündige Spaltung von β -Methylcrotonyl-CoA- Carboxylase mit Pepsin	91
22. Überführung von Biotin und Biotinpeptiden in das Sulfoniumsalz	92
23. Spaltung des Sulfoniumsalzes des Biotinpeptids der halbstündigen peptischen Spaltung mit Trypsin	92
VIII. Zusammenfassung	95
IX. Literaturverzeichnis	97
Lebenslauf	

Verwendete Abkürzungen:

CoA	CoA-SH	Coenzym A
ATP		Adenosintriphosphat
ADP		Adenosindiphosphat
NADH		Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid reduziert
DEAE		Diäthylaminoäthyl-
EDTA		Äthylendiamintetraacetat
Tris		Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
μ -		Mikro
μ		Mikrometer
m μ		Nanometer
AE		Aktivitätseinheiten
Imp		Impulse
U		Umdrehungen
g		Erdbeschleunigung
mg		Milligramm
μ g		Microgramm
gr		Gramm
h		Stunden
η		Viscosität

I. Einleitung und Problemstellung

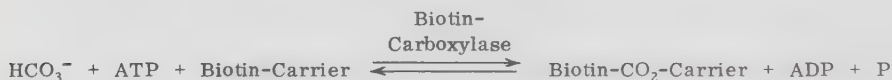
Der Evolution der Lebewesen zu der heute herrschenden immensen Vielfalt entspricht einer Evolution der Proteine, die ja die unmittelbare Ausdrucksform der Gene darstellen. Durch die Proteine eines Lebewesens wird dessen Erscheinungsform bestimmt. So findet auch die allgemeine Beobachtung, daß in der Natur eine einmal entwickelte Form viel eher variiert wird, als daß etwas völlig Neues entsteht, ihre Entsprechung in der Evolution der Proteine. Ein bekanntes Beispiel für die Variation einer Form ist der Aufbau der Hand. Die Variationen reichen vom Flügel des Vogels bis zum Huf des Pferdes. In allen Fällen findet sich die gleiche Ordnung von Knochen. Dem jeweiligen Zweck angepaßt, sind die einzelnen Teile in besonderer Weise entwickelt. So trägt jede Form die Geschichte ihrer Entstehung in sich. Die Hand, der Huf, der Flügel lassen sich auf eine gemeinsame Urform zurückführen.

Der Grund für dieses Phänomen liegt darin, daß jede Zwischenform in der Entwicklung zu einer neuen Form, sich in der Selektion gegen die Ausgangsform behaupten können muß. Würde eine völlig neue Form "angestrebt", so würde das im allgemeinen eine weniger angepaßte Zwischenform notwendig machen. Somit käme auch eine mögliche bessere Form nicht zum Zuge.

In entsprechender Weise lassen sich damit auch für die Proteine Stammbäume der Evolution aufstellen. In den verschiedenen Lebewesen findet sich das entsprechende Protein in einer jeweils abgewandelten Form. Der entwicklungsgeschichtliche Abstand zweier entsprechender Proteine ist umso größer, je mehr Aminosäuren in der Sequenz ausgetauscht, verlorengegangen oder hinzugekommen sind. Dieses Prinzip der Variation bewirkt aber nicht nur die Anpassung der verschiedenen Funktionen eines Lebewesens an seine Umwelt, es bewirkt auch die Entwicklung komplizierterer Organismen. "Benötigt" ein Organismus ein Protein mit einer, im Vergleich zu einem bereits vorhandenen, ähnlichen Funktion, so wird das neue im allgemeinen aus dem bereits vorhandenen entwickelt. So ergeben sich schließlich ganze "Familien" von Proteinen. Die Abzweigung eines neuen Proteins läßt sich gleichfalls in den Evolutionsstammbaum einführen. Damit läßt sich das entwicklungsgeschichtliche Stadium angeben, in dem die Abzweigung stattgefunden hat.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem Aspekt der Entwicklung der Biotinenzyme (1, 2). 1969 veröffentlichten Wood et al. eine Arbeit über die Aufspaltung von Methylmalonyl-Pyruvat Transcarboxylase in Untereinheiten; dabei fanden sie, daß das Biotin, das als prosthetische Gruppe an der Umsetzung beteiligt ist, mit einer ungewöhnlich kleinen Proteinuntereinheit vom Molekulargewicht 12 000 verbunden ist (3). Zu etwa der gleichen Zeit isolierten Vagelos et al. eine entsprechende Untereinheit aus *E. coli*-Acetyl-CoA-Carboxylase (4-7). In Anlehnung an das Acylcarrier-Protein aus Fettsäuresynthetase (8), einer kleinen Proteinuntereinheit, an der Panthotensäure als prosthetische Gruppe hängt, wurde sie Biotin-Carboxylcarrier-Protein genannt.

Man nimmt an, daß das Biotin-Carboxylcarrier-Protein in der Frühphase der Entwicklung eine ähnliche Funktion erfüllte, wie das Acylcarrier-Protein in *E. coli* (8). Es müßte ein Biotin-carboxylierendes Enzym existiert haben, das das am Carrier-Protein haftende Biotin gemäß dem Schema von Lynen (9-19) carboxylierte.



Der frei herumdiffundierende "Carrier" hätte sich dann mit einem speziellen carboxylierenden Enzym verbunden und das Substrat wäre carboxyliert worden (Abb. 1).



In den gegenwärtigen hochentwickelten Enzymen sind diese Funktionen im allgemeinen in einem Komplex vereinigt.

Ein Argument für diese Hypothese ließe sich durch den Vergleich der Biotin-Carboxylcarrier-Proteine zweier Biotinenzyme aus dem gleichen Organismus gewinnen. Erwiesen sie sich untereinander im Vergleich zu den beiden in ihrer Zusammensetzung aufgeklärten Biotin-Carboxylcarrier-Proteinen aus *Propionibacterium shermanii* (3) und *Escherichia coli* (7) als ähnlicher, so würde das bedeuten, daß sich die entsprechenden Bakterienarten wahrscheinlich entwicklungsgeschichtlich früher getrennt haben, als die beiden "Carrier". Das Prinzip des für mehrere carboxylierende Enzyme gemeinsamen frei diffundierenden "Carriers" wäre dann über eine lange entwicklungsgeschichtliche Phase aufrecht erhalten worden (Abb. 2).

Die im folgenden beschriebenen Versuche wurden mit diesem Ziel in Angriff genommen.

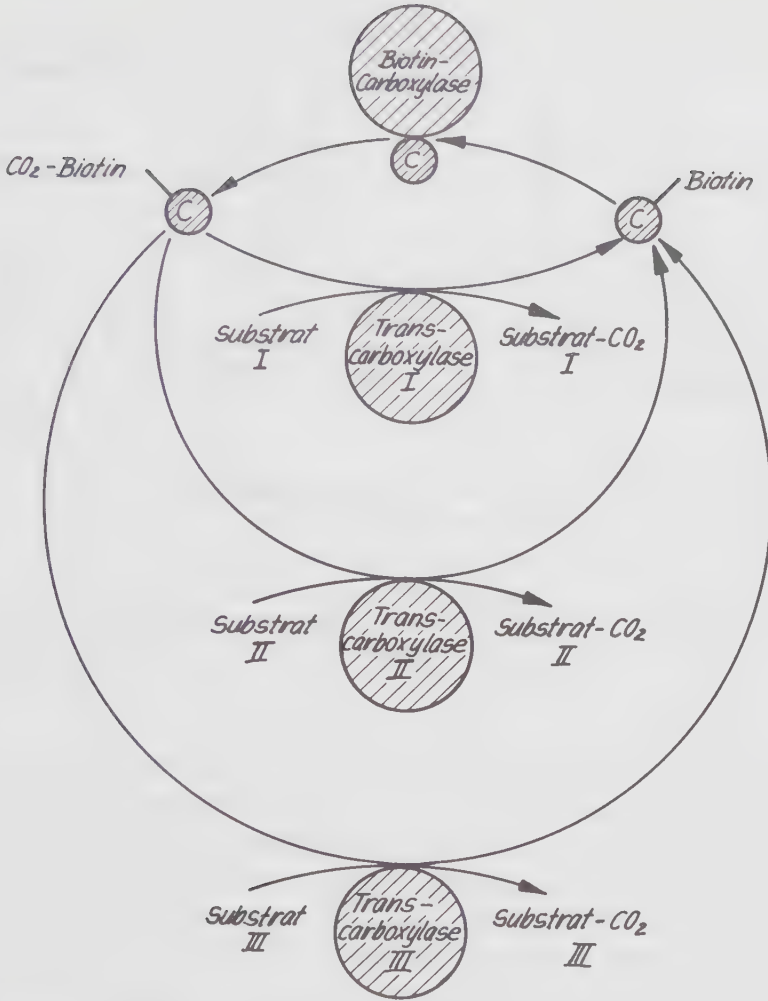


Abb. 1 zeigt den hypothetischen Mechanismus der Carboxylierung mit Biotinenzymen in einer frühen Phase der bakteriellen Evolution, wobei das "aktivierte CO₂" mit einem frei diffundierenden kleinen Protein © übertragen wird

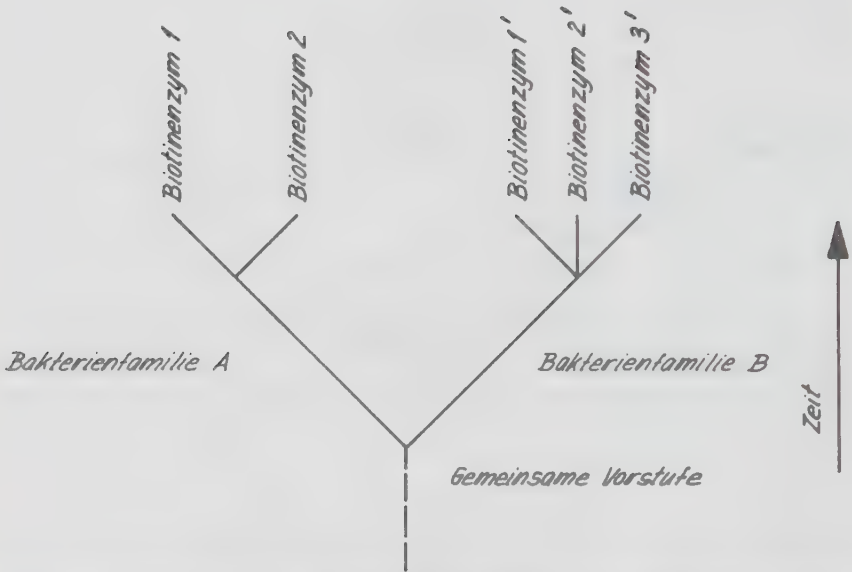


Abb. 2 veranschaulicht die hypothetische Entwicklung eines zunächst allen Biotin-Enzymsystemen gemeinsamen Biotin-Carboxylcarrier-Proteins in der bakteriellen Evolution

Trennen sich zwei Bakterienfamilien im Laufe der Evolution, so entwickeln sich auch die Biotin-Carboxylcarrier-Proteine auseinander. Bei der Bildung eines Multienzym-Komplexes aus der Biotin-Carboxylase, dem Biotin-Carboxylcarrier-Protein und der spezifischen Carboxyl-Transferase können sich dann für das jeweilige Biotinenzym spezifische Biotin-Carboxylcarrier-Proteine bilden.

II. Zur Züchtung von Achromobacter IVS

Der Stamm wurde von Schlegel aus Schafspannen isoliert. Beim Plattieren auf Fleisch-extraktagar (20) fanden wir zwei verschiedene Kolonieformen

1. eine scharf begrenzte, undurchsichtige
2. eine durchsichtige, verschwommene Form.

Beide Formen können auf Isovaleriansäure-Minimalmedium wachsen. Gelegentlich entsteht aus einer Kolonie der Form 1 eine neue Kolonie der Form 2. Der umgekehrte Vorgang wurde nicht beobachtet. In Mischkulturen überwiegt der Typ 1. Im allgemeinen wurden Kulturen des Typs 1 verwendet, anfangs auch Mischkulturen.

Die Methode zur Züchtung in Isovaleriansäure-Minimalmedium wurde von K. Rehn übernommen (21):

Die Bakterien werden von Fleischextrakt Agar auf Isovaleriansäure-Agar, weiter in eine 100-ml-, dann in eine 1-Ltr.-Schüttelkultur übertragen. Dann erfolgt der Übergang auf eine 6-Ltr.-Belüftungskultur. Dabei ergaben sich bisher meist Schwierigkeiten. Die Bakterien wuchsen in der Belüftungskultur häufig nur sehr langsam und oft stagnierte das Wachstum bei geringer Bakteriendichte. Während sich eine gute Kultur bald rötlich und dann tief rotbraun färbt, blieb diese blaß.

Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen, wurden je 50 ml aus einer 100-ml-Schüttelkultur in einer 1-Ltr.-Belüftungskultur und einer 1-Ltr.-Schüttelkultur parallel weitergezüchtet. Wie Abb. 3 zeigt, entwickelte sich die Schüttelkultur zunächst wesentlich besser. Nach 35-40 Stunden jedoch nahm die Wachstumsgeschwindigkeit der Belüftungskultur stark zu und nach 67 Stunden war die Trübung der beiden Kulturen gleich stark. Offensichtlich waren die Wachstumsbedingungen zu Beginn der Züchtung bei der Schüttelkultur, später bei der Belüftungskultur günstiger. Da bei großer Bakteriendichte die Luftzufuhr bei der Schüttelkultur limitierend wirkt, mußte umgekehrt die anfängliche Luftzufuhr der Belüftungskultur zu stark gewesen sein. Tatsächlich ließ sich bei langsam mit der Bakteriendichte gesteigerten Belüftung auch in sämtlichen späteren Züchtungen gutes Wachstum erzielen (Abb. 4) (Einzelheiten siehe "Experimenteller Teil").

Der 6-Ltr.-Belüftungskultur wurde des öfteren kaltes Biotin zugesetzt, da es sich zeigte, daß Biotin erst 12 Std. nach der Zugabe von den Bakterien aufgenommen wird (Abb. 5). Die Bakterien wurden damit an die Biotin-Aufnahme adaptiert und konnten das radioaktive Biotin in der anschließenden 5 x 20-Ltr.-Kultur unmittelbar aufnehmen.

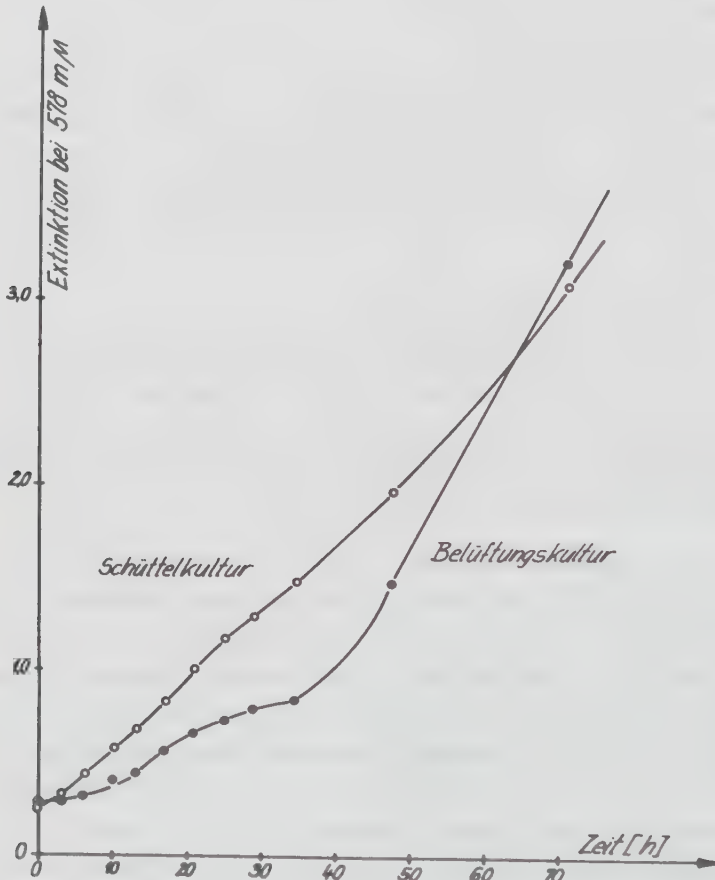


Abb. 3 Parallelzüchtung von *Achromobacter* IVS in Schüttel- und Belüftungskultur

Eine 100-ml-Schüttelkultur wurde zu je gleichen Teilen auf die beiden 1-Ltr.-Medien verteilt.

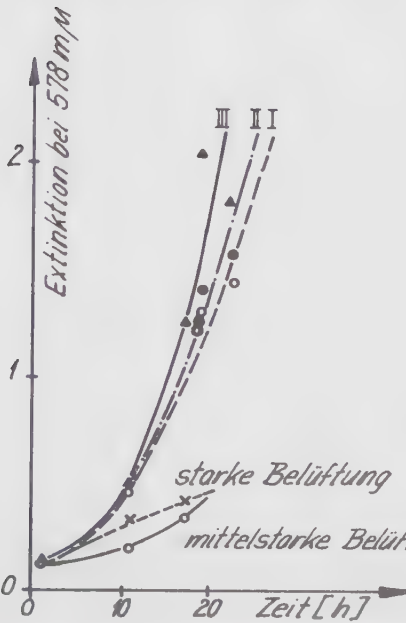
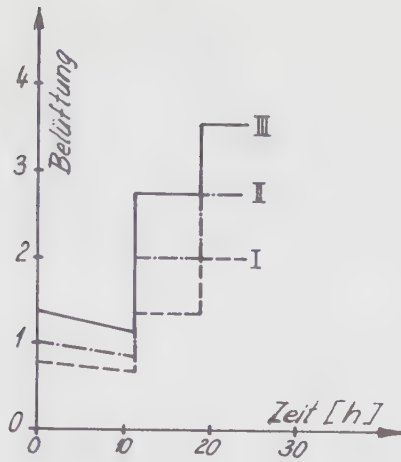


Abb. 4 Wachstum von fünf 17-Ltr.-Belüftungskulturen in Isovaleriansäure-Minimalmedium

Die Kulturen I, II, III wurden stufenweise gesteigert, vergleichsweise jedoch schwach belüftet. Die "mittelstarke" Belüftung entspricht etwa einem Wert von 20 auf der Belüftungsskala.

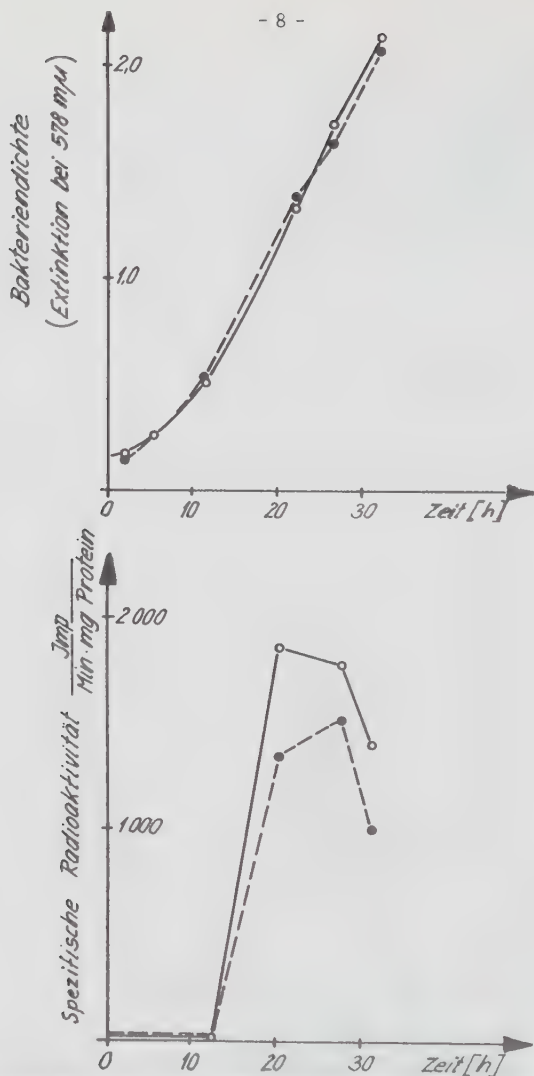
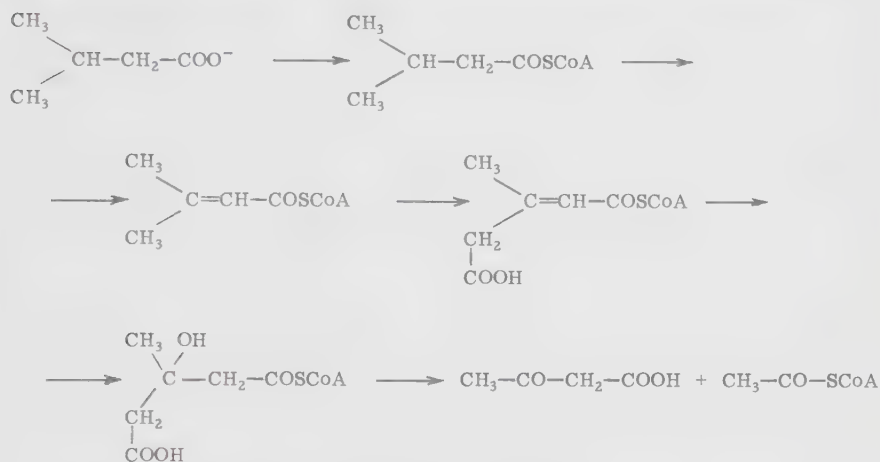


Abb. 5 Bestimmung der Zeit die nach der Zugabe von Biotin zum Medium vergeht, bis es von *Achromobacter* IVS aufgenommen wird

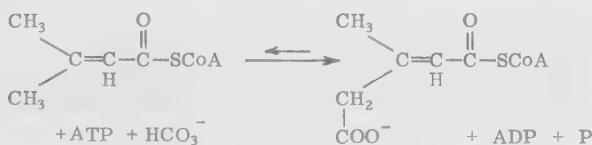
Achromobacter IVS, der in der beschriebenen Weise in Isovaleriansäure-Minimalmedium gezüchtet worden war, wurde auf zwei 17-ltr.-Isovaleriansäure-Medien übertragen, denen je $0.33 \mu\text{Mol } ^{14}\text{C-Biotin}$ (10^7 Imp/Min) zugesetzt wurden. In bestimmten Abständen wurden beiden Kulturen Proben entnommen. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und mit dem kleinen Homogenisator nach Merckenschlager, Schloßmann und Kurz (22) aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde 45 Min. bei 75.000 g zentrifugiert und die spezifische Radioaktivität des klaren Überstandes bestimmt.

III. Biotin-haltige Proteine in Achromobacter IVS

Achromobacter IVS vermag in einem Minimalmedium mit Isovaleriansäure als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen (11). Unter diesen Bedingungen wird β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase in großer Menge gebildet, da Isovaleriansäure nur über die folgende Reaktionskette als Kohlenstoffquelle nutzbar gemacht werden kann:



β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase katalysiert dabei den folgenden Reaktionsschritt (10):



Setzt man dem Medium radioaktiv markiertes Biotin zu und chromatographiert den zellfreien Rohextrakt aus den abzentrifugierten Bakterien über Sephadex G 200, so erscheinen zwei radioaktive Gipfel (Abb. 6). Der erste Gipfel zeigt die Aktivität der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase. Ein ähnliches Ergebnis erhält man bei der Chromatographie an DEAE-Zellulose. Hier findet sich die Aktivität der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase im zweiten radioaktiven Gipfel (Abb. 7).

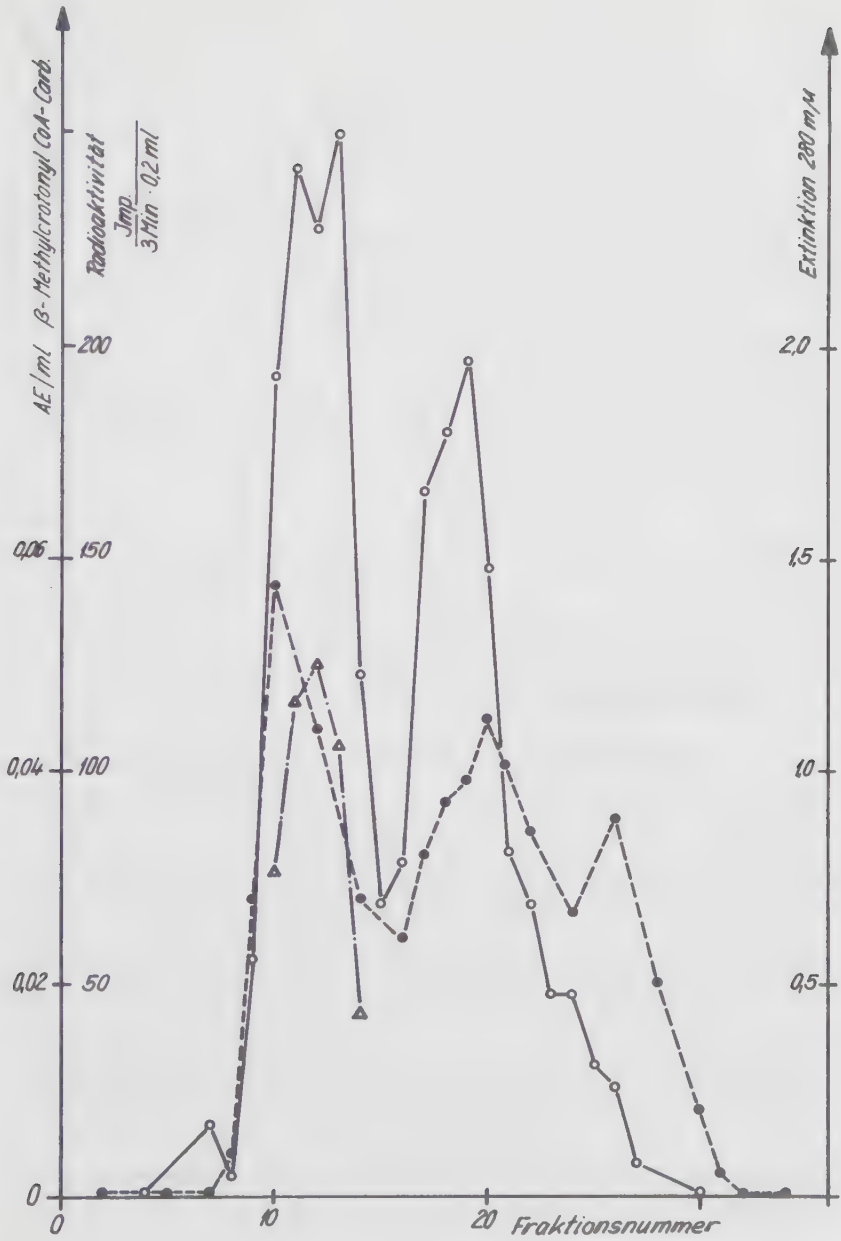
Überträgt man eine solche Kultur in ein Minimalmedium, welches Acetat als einzige Kohlenstoffquelle enthält, so erscheint nach einiger Zeit bei der Chromatographie an

DEAE-Zellulose nur noch der erste radioaktive Gipfel (Abb. 8). Nach der Sedimentation im Saccarosegradienten (Abb. 15) und der Chromatographie an Sephadex (Abb. 9) hat dieses Biotin-Protein ein Molekulargewicht im Bereich von 10 000. Da hohe Aktivitäten der Enzyme des Glyoxylsäure-Cyclus in *Achromobacter* IVS gefunden wurden (23), Pyruvat-Carboxylase also nicht notwendig ist, ist es wahrscheinlich, daß es sich hier um das der Acetyl-CoA-Carboxylase zugehörige Biotin-Carboxylcarrier-Protein handelt.

Abb. 6 Chromatographie eines Rohextraktes aus *Achromobacter* IVS
an Sephadex G 200

0.7 g gefriergetrockneter radioaktiver Bakterien aus einer 17-Ltr.-Kultur in Iso-valeriansäure-Minimalmedium (s. exp. Teil), das $0.3 \mu\text{Mol}$ ($105 \mu\text{C/mg}$) ^{14}C -Biotin enthielt, wurden bei 4°C in 1 ml $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ suspendiert und durch Reiben mit Al_2O_3 -Pulver aufgeschlossen. Dann wurden weitere 4 ml $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ zugesetzt. Die Lösung wurde 25 Min. bei 100 000 g zentrifugiert. 2.2 ml des Überstandes ($14\,000 \text{ Imp./min}$) wurden auf eine Sephadex-G-200-Säule ($97.5 \times 1 \text{ cm}$) aufgesetzt, die mit 0.03 M Kalium-Phosphatpuffer pH 7.2 äquilibriert war. Eine Fraktion enthielt 3.25 ml.

Die durchgezogene Linie bedeutet Radioaktivität, die gestrichelte Linie Extinktion bei $280 \text{ m}\mu$, die strich-punktierte Linie β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase-Aktivität.



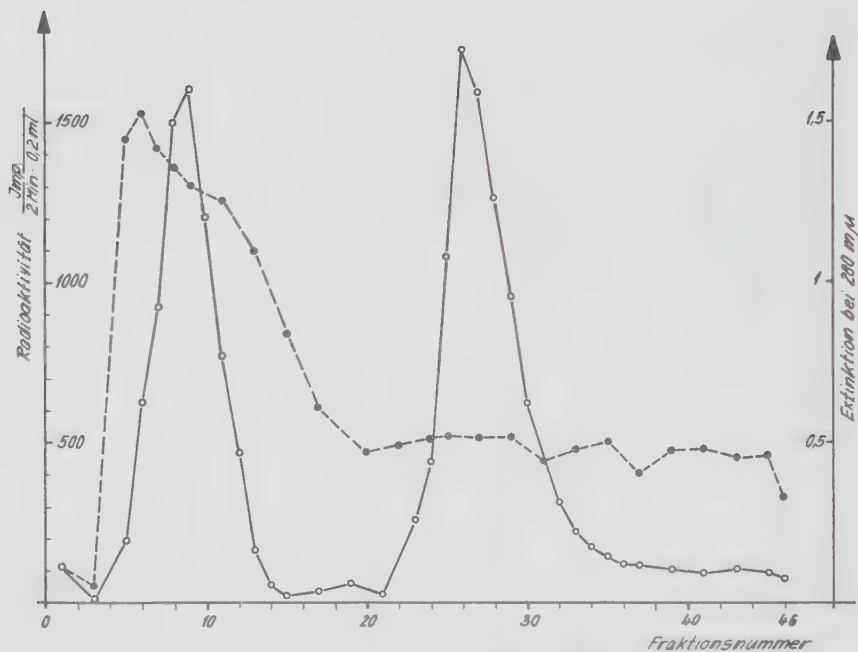


Abb. 7 Chromatographie eines Rohextrakts aus *Achromobacter* an DEAE-Cellulose

2 g gefriergetrockneter Bakterien aus einer 17-Ltr.-Kultur in Isovalerial-Minimalmedium (s. exp. Teil), das $0.3 \mu\text{Mol}$ ($105 \mu\text{C/mg}$) ^{14}C -Biotin enthielt, wurden mit $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ gewaschen und anschließend in 15 ml derselben Lösung im Homogenisator nach Merckenschlager, Schlossmann und Kurz aufgeschlossen. Die Lösung wurde 30 Min. bei 75 000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine DEAE-Zellulose-Säule (16 x 2.4 cm) aufgesetzt und mit 400 ml eines linearen Gradienten von 0.1 – 0.5 M NaCl in 0.03 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.2 eluiert. Die Fraktionen enthielten 8.7 ml.

Die durchgezogene Linie bedeutet Radioaktivität, die gestrichelte Linie Extinktion bei 280 m μ .

Die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase erscheint im zweiten radioaktiven Gipfel. Je nach Züchtung enthält sie 50–80% der Radioaktivität.

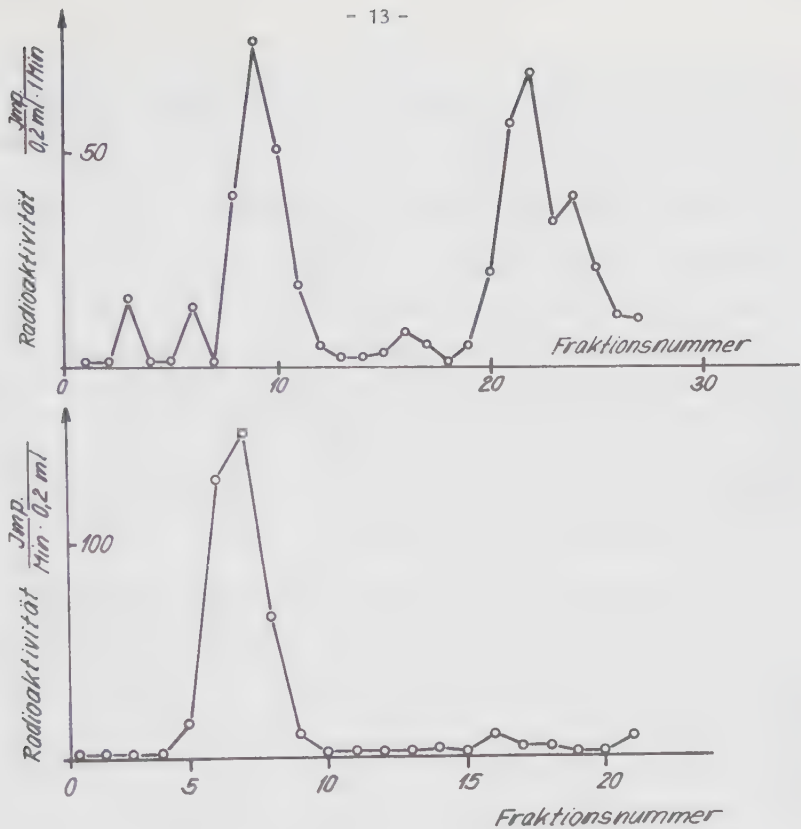


Abb. 8 Chromatographien von Rohextrakten aus *Achromobacter IVS* an DEAE-Zellulose

oben: 18 $\frac{1}{2}$ Stdn. unten: 42 $\frac{1}{2}$ Stdn.

nachdem die Bakterien von einem ^{14}C -Biotin-haltigen Isovaleriansäure-Minimalmedium auf ein Acetat-Minimalmedium ohne Biotin übertragen wurden.

Die Bakterien wurden zunächst in 100 ml Isovaleriansäure-Medium (s. exp. Teil), das $0.01 \mu\text{Mol } ^{14}\text{C}$ -Biotin ($105 \mu\text{C}/\text{mg}$) enthielt, gezüchtet. Nach 19 Stdn. 40 Min. wurden die Bakterien abzentrifugiert. Ein Teil davon wurde in 1 Ltr. Acetat-Minimalmedium ohne Biotin übertragen (s. exp. Teil). In bestimmten Abständen wurden Teile der Kultur abzentrifugiert. Die Bakterien wurden mit etwa dem doppelten Volumen an Al_2O_3 zerrieben, mit $0.01 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung aufgenommen und 10 Min. bei $100\,000 \text{ g}$ abzentrifugiert. Die Überstände wurden jeweils auf eine DEAE-Zellulose-Säule ($16 \times 1.2 \text{ cm}$) aufgetragen und mit 50 ml eines linearen Gradienten von 0.1 bis 0.5 M NaCl in 0.03 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.2 eluiert.

IV. Isolierung und einige Eigenschaften eines Biotin-Carboxylcarrier-Proteins aus Achromobacter IVS

1. Die Anreicherung des Biotin-Carboxylcarrier-Proteins

Zur Anreicherung von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase wird der Rohextrakt aus Achromobacter zunächst einem Geladsorptionsschritt unterworfen. Hierbei wird das "freie" Biotin-Carboxylcarrier-Protein von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase getrennt. Während die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase nach zwei Waschschritten mit 0.01 M K-Phosphatpuffer pH 6.0 mit 0.04 M K-Phosphatpuffer pH 6.4 eluiert wird, findet sich das Biotin-Carboxylcarrier-Protein überwiegend im Überstand der Geladsorption. Daß dabei kein Biotin-Carboxylcarrier-Protein aus β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase abgespalten wird, zeigt die Bilanz eines Gelschritts (Tabelle 1).

Zur weiteren Anreicherung des Biotin-Carboxylcarrier-Proteins wird der Überstand der Geladsorption eingeengt. Dann folgt eine Acetonfällung, die bei Raumtemperatur durchgeführt werden kann. In die Lösung wird das 1.75fache Volumen an Aceton eingebracht. Der Niederschlag wird abzentrifugiert. Das Biotin-Carboxylcarrier-Protein bleibt dabei im Überstand (Einzelheiten siehe "Experimenteller Teil"). Die Acetonfällung ist ein sehr wirkungsvoller Anreicherungsschritt; es wird dabei ähnlich viel Protein ausgefällt wie mit Trichloressigsäure.

Der Überstand wird eingeengt und anschließend über eine Sephadex G 75-Säule chromatographiert, die mit einer Lösung von 0.03 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.2 und 0.02% NaN_3 äquilibriert ist (Abb. 9).

Die Hauptfraktionen der Chromatographie an Sephadex werden vereinigt und direkt auf eine DEAE-Zellulosesäule (25 x 3 cm) aufgesetzt. Das Protein wird mit 900 ml eines linearen Gradienten von 0 bis 0.2 M NaCl in 0.01 M Tris/HCl-Puffer pH 8.45 in 0.02proz. NaN_3 -Lösung eluiert (Abb. 10).

Die Gipfelfraktion der Chromatographie an DEAE-Zellulose wurden durch Membranfiltration mit einem UM-2-Filter konzentriert, teilweise entsalzt und dann der isoelektrischen Fokussierung mit Ampholinlösung pH 3-5 unterworfen (24, 25) (Abb. 11) oder an Phosphozellulose chromatographiert.

Die Phosphozellulose-Säule war mit 0.01 M Natriumacetatpuffer pH 4.0 äquilibriert. Das Protein wurde mit 110 ml eines linearen Gradienten von 0 bis 0.3 M NaCl in 0.01 M Natriumacetatpuffer pH 4.0 eluiert (Abb. 12). Bei diesem Anreicherungsschritt wurden des öfteren, wahrscheinlich durch ausfallendes Protein, größere Mengen an Radioaktivität verloren. Bei einem höheren pH-Wert war dagegen der Reinigungseffekt geringer.

Tabelle 1 Verteilung von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase-Aktivität und Radioaktivität beim Gelschritt

	Enzymaktivität [AE]	Radioaktivität [Imp/Min]	Aktivität Radioaktivität [AE/[Imp/Min]
Überstand der Geladsorption	0	$3.050 \cdot 10^6$	0.00
1. Waschflüssigkeit (0,015 M K-Phosphatpuffer pH 6.0)	190	$2.330 \cdot 10^6$	$0.81 \cdot 10^{-4}$
2. Waschflüssigkeit (0,010 M K-Phosphatpuffer pH 6.0)	57	$0.494 \cdot 10^6$	$1.16 \cdot 10^{-4}$
Elution mit 0.03 M K-Phosphatpuffer pH 6.4	939	$5.340 \cdot 10^6$	$1.76 \cdot 10^{-4}$
Elution mit 0.10 M K-Phosphatpuffer pH 6.6	80	$0.968 \cdot 10^6$	$0.83 \cdot 10^{-4}$
1. Elution mit 0.20 M K-Phosphatpuffer pH 6.8	0	$0.172 \cdot 10^6$	0.00
2. Elution mit 0.20 M K-Phosphatpuffer pH 6.8	0	$0.062 \cdot 10^6$	0.00
Summe:	1266	$12.32 \cdot 10^6$	
Eingesetzter Rohextrakt:	1354	$11.03 \cdot 10^6$	

Tabelle 2 Relative Ausbeuten der Anreicherungsschritte des Biotin-Carboxylcarrier-Proteins

Acetonfällung	50-70 %
Chromatographie an Sephadex G 75	55-70 %
Chromatographie an DEAE-Zellulose	60-80 %
Isoelektrische Fokussierung	50-70 %

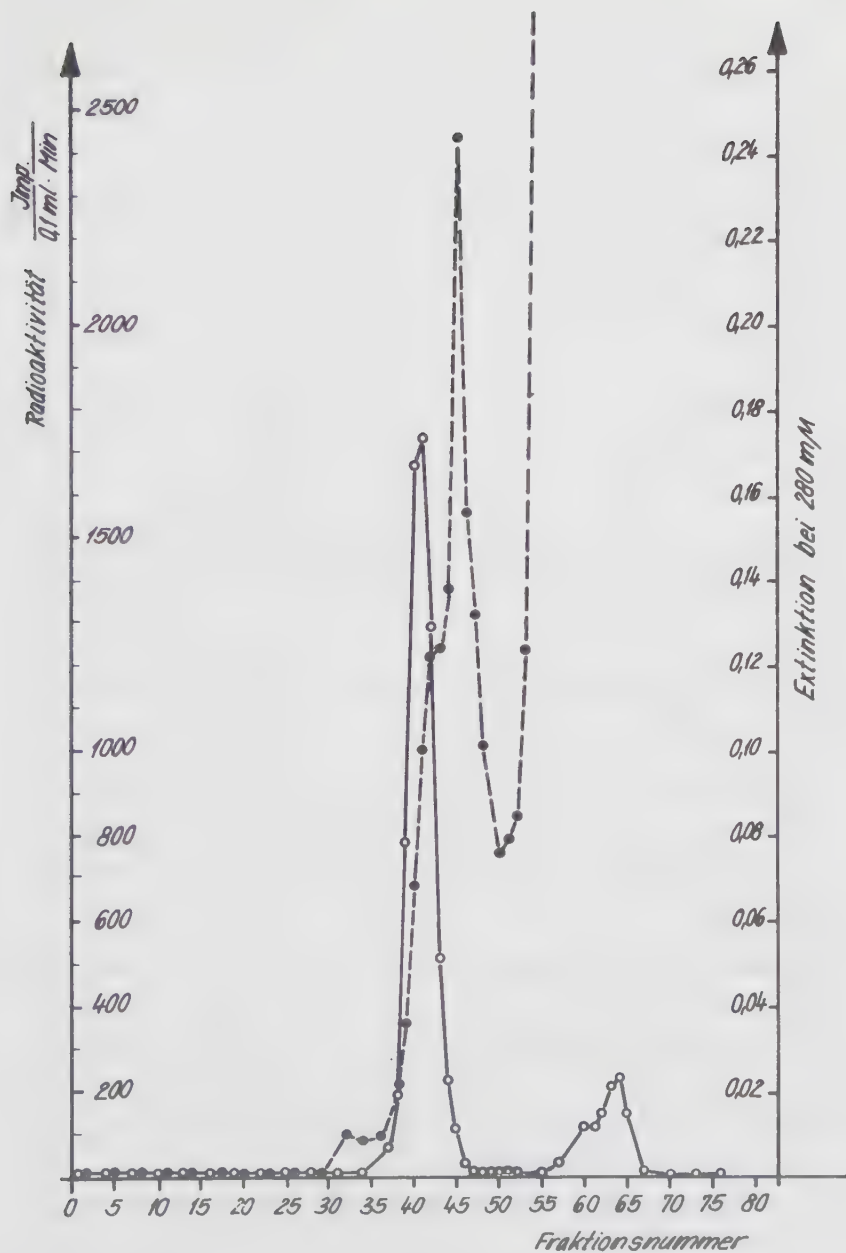
Da nach der Acetonfällung nurmehr wenig Protein vorhanden war, das Biotin-Carboxylcarrier-Protein bei $280\text{ m}\mu$ aber kaum zu absorbieren scheint, waren keine genauen Proteinbestimmungen zu erwarten. Es wurde deshalb überhaupt auf Proteinbestimmungen verzichtet. Die einzelnen Anreicherungsschritte wurden durch Disk-Elektrophorese kontrolliert.

Abb. 9 Chromatographie eines Überstandes der Gelabsorption nach Acetonfällung, an einer Sephadex-G-75-Säule (126 x 2,3 cm) bei 5°C →

Die Säule war mit einer Lösung von 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.2 und 0,02 % NaN_3 äquilibriert. Das Volumen pro Fraktion betrug 9,0 ml.

Die durchgezogene Linie bedeutet Radioaktivität; die gestrichelte Linie Extinktion bei $280\text{ m}\mu$.

Im vorderen radioaktiven Gipfel erscheint das "freie" Biotin-Carboxylcarrier-Protein, der hintere dürfte durch freies Biotin verursacht sein.



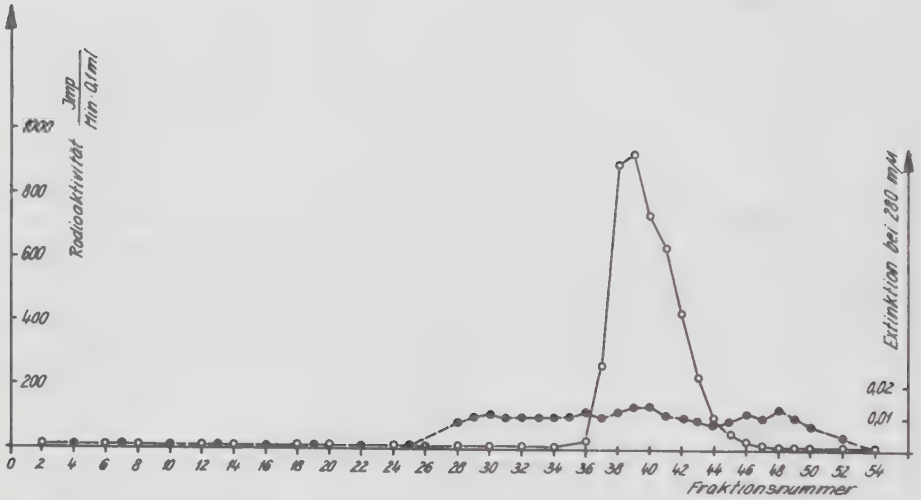


Abb. 10 Chromatographie des Biotin-Carboxylcarrier-Proteins an DEAE-Zellulose

Die Hauptfraktion der Chromatographie an Sephadex G 75 (Abb. 9) wurde direkt auf die Säule (22.5 x 2.9 cm) aufgesetzt und mit 800 ml eines linearen Gradienten von 0-0.2 M NaCl in 0.01 M Tris/HCl-Puffer pH 8.45 bei 5°C eluiert. Das Volumen pro Fraktion betrug 15.6 ml.

Die durchgezogene Linie bedeutet Radioaktivität; die gestrichelte Linie Extinktion bei 280 m μ .

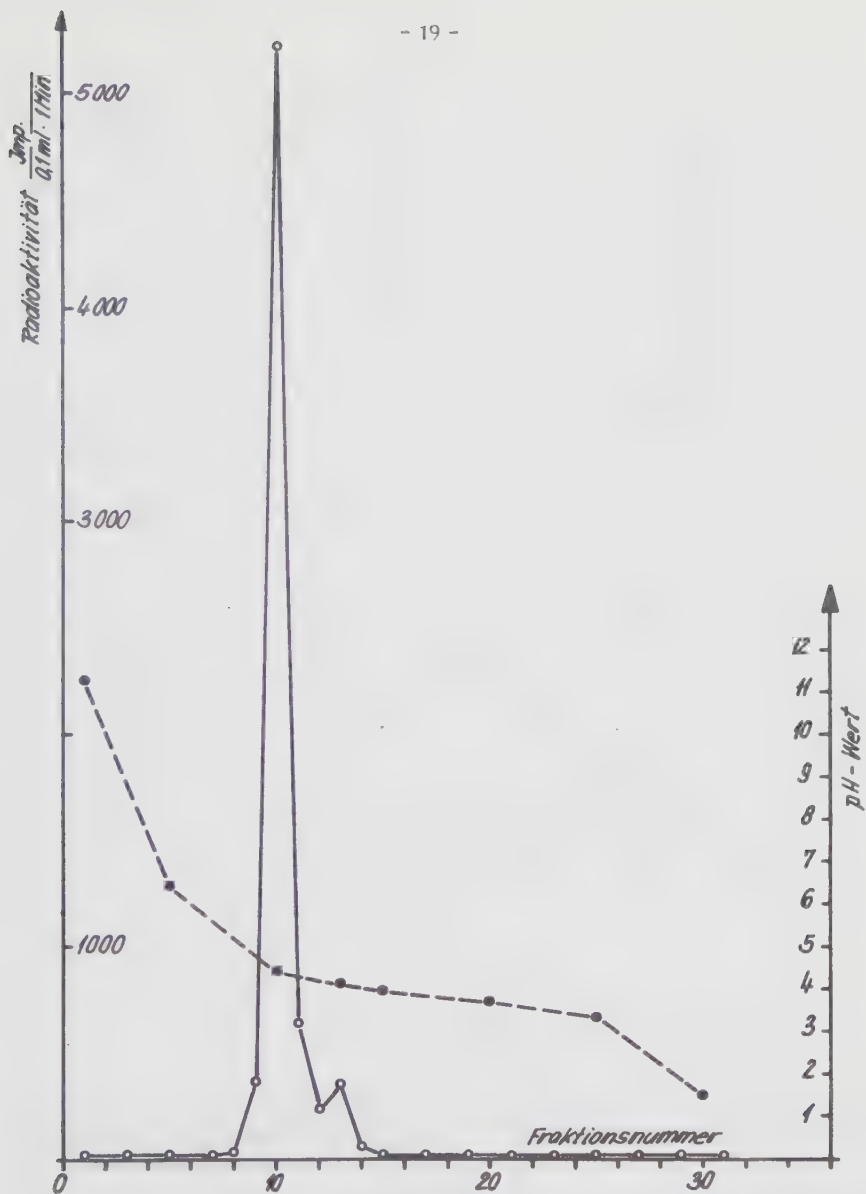


Abb. 11 Isoelektrische Fokussierung des ^{14}C -Biotin-Carboxylcarrier-Proteins mit Ampholine pH 3-5. — Radioaktivität, --- pH-Wert.

Die Gipfelfractionen der Chromatographie an DEAE-Zellulose wurden zunächst durch Membranfiltration weitgehend entsalzt und dann isoelektrisch fokussiert. Die Fraktionen hatten ein Volumen von 3.5 ml.

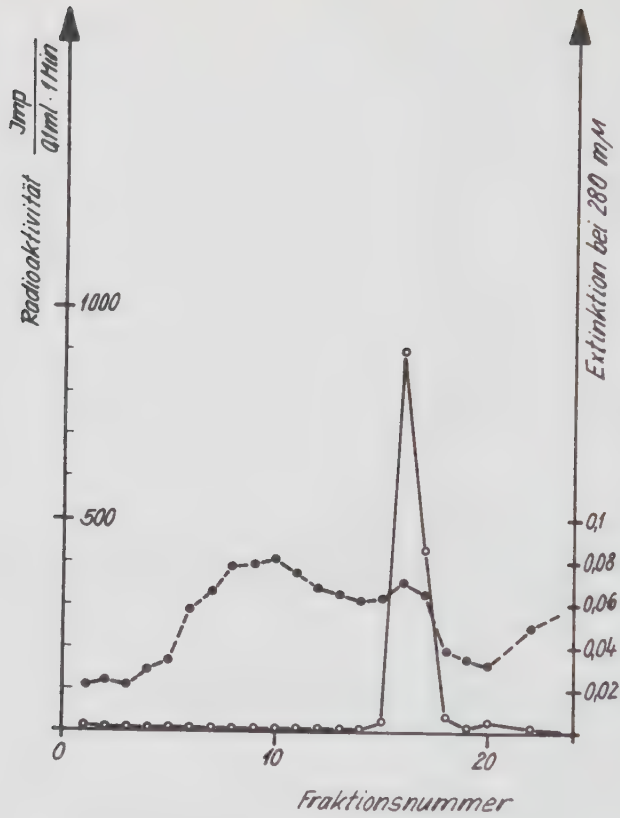


Abb. 12 Chromatographie des Biotin-Carboxylcarrier-Proteins
an Phosphozellulose

Die Hauptfraktion der Chromatographie an DEAE-Zellulose wurde durch Membranfiltration konzentriert und auf eine Salzkonzentration unter 0.01 M gebracht. Das Protein wurde auf eine Phospho-Zellulose-Säule (20.6 x 1.1 cm) aufgesetzt und bei 5°C mit 110 ml eines linearen Gradienten von 0-0.3 N NaCl in 0.01 M Natriumacetatpuffer pH 4.0 eluiert.

Die durchgezogene Linie bedeutet Radioaktivität, die gestrichelte Linie Extinktion bei 280 mμ.

2. Eigenschaften des Biotin-Carboxylcarrier-Proteins

Nach diesen Reinigungsschritten ist das Biotin-Carboxylcarrier-Protein meist frei von Begleitproteinen. Abb. 13 und 14 zeigen die Disk-Elektrophoresen des Biotin-Carboxylcarrier-Proteins in drei verschiedenen Gelsystemen. Der r_f -Wert im Natriumdodecylsulfat-Gel (Abb. 14) entspricht einem Molekulargewicht von etwa 35 000. Im Gradientenlauf nach Martin und Ames (26) hingegen sedimentiert das Biotin-Carboxylcarrier-Protein langsamer als Cytochrom c (Abb. 15).

Auch bei der Chromatographie an Sephadex (Abb. 9) verhält es sich wie ein Protein mit einem Molekulargewicht um 10 000.

Da eine geringe Sedimentationsgeschwindigkeit auch durch ein sehr kleines spezifisches Gewicht bedingt sein kann, wurde das Biotin-Carboxylcarrier-Protein einem Dichtegradientenlauf (27) in 2.25 M CsCl in 5 M Harnstoff bei 25°C unterworfen. Daraus ergab sich ein spezifisches Gewicht von etwa 1.25 (Abb. 16).

Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins bei einer Disk-Elektrophorese hängt von dessen Größe und Ladung ab. Die Möglichkeit, das Molekulargewicht aus dem r_f -Wert bei der Elektrophorese in Dodecylsulfat-Lösung zu bestimmen, beruht auf der reichlichen Beladung des Proteins mit Dodecylsulfat, das damit stark negativ aufgeladen wird. Trifft diese Voraussetzung nicht zu, so ist die Molekulargewichtsbestimmung unrichtig. Das Biotin-Carboxylcarrier-Protein wurde deshalb mit Cyanat umgesetzt (28, 29), um die positiven Ladungen zu neutralisieren.



Tatsächlich wanderte das so veränderte Biotin-Carboxylcarrier-Protein in der Natrium-Dodecylsulfat-Diskelektrophorese wesentlich schneller. Der r_f -Wert lag bei 0.88 (Abb. 17).

Eine ähnlich erhöhte Wanderungsgeschwindigkeit zeigte das Biotin-Carboxylcarrier-Protein, wenn man es in Natriumdodecylsulfat-Lösung auf 80°C erhitzte und anschließend der Diskelektrophorese unterwarf (Abb. 18). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß das Biotin-Carboxylcarrier-Protein eine sehr stabile Konformation besitzt.

Das Biotin-Carboxylcarrier-Protein verbindet sich mit Avidin (30, 31) wie aus Abb. 19 zu ersehen ist. Dabei wurden das "Carrier-Protein" nach Reaktion mit einem Überschuß an Avidin und unbehandeltes "Carrier-Protein" als Referenz in einem Saccharose-Gradienten sedimentiert. Der "Carrier-Protein"-Avidin-Komplex hatte ungefähr 5,8 S.

Der isoelektrische Punkt des Biotin-Carboxylcarrier-Proteins liegt bei pH 4,45 (Abb. 11).



Abb. 13a

Diskelektrophorese des Biotin-Carboxyl-carrier-Proteins bei pH 9.5 in 7.5proz. Acrylamid-Gel

2 800 Imp/min ^{14}C -Biotin-Carboxyl-carrier-Protein wurden auf ein Gelröhrchen nach Maurer System 1 (32) aufgesetzt. Die Elektrophorese wurde bei 650 V durchgeführt; sie dauerte 2 Stdn. 20 Min.

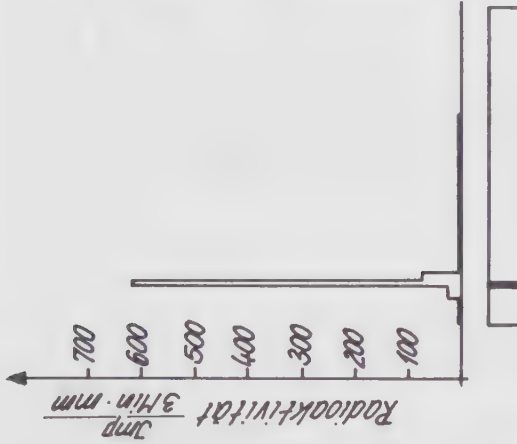


Abb. 13 b

Diskelektrophorese des Biotin-Carboxyl-carrier-Proteins bei pH 3.8 in 7.5proz. Acrylamid-Gel

1 500 Imp/min ^{14}C -Biotin-Carboxyl-carrier-Protein wurden auf ein Gelröhrchen nach Maurer System 8 (32) aufgesetzt. Die Elektrophorese wurde bei 280 V durchgeführt. Sie dauerte 3 Stdn. 9 Min.

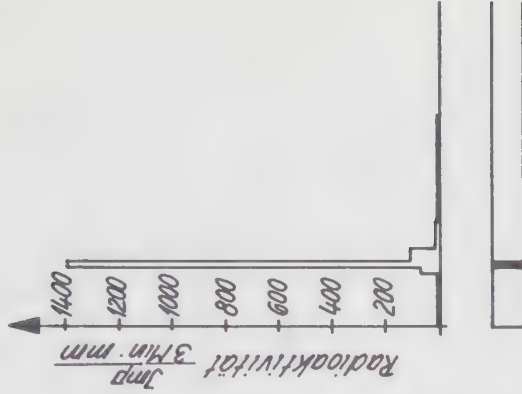


Abb. 14

Diskelektrophorese des Biotin-Carboxyl-carrier-Proteins in Natrium-dodecylsulfatlösung

3 200 Imp/min ^{14}C -Biotin-Carboxyl-carrier-Protein wurden auf ein 10proz. Acrylamid-Gel (0.54 % N.N'-Methyl-bisacrylamid) nach Weber und Osborn (33, 34) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 40 V durchgeführt, sie dauerte 4 Stdn. 33 Min.

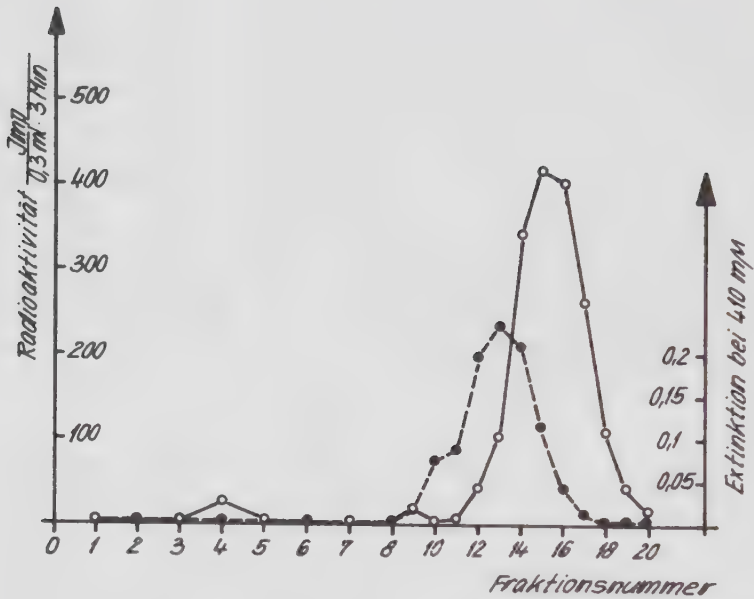


Abb. 15 Gemeinsame Sedimentation von ^{14}C -Biotin-Carboxylcarrier-Protein und Cytochrom c im Saccharosegradienten nach Martin und Ames (26)

1 200 Imp/min ^{14}C -Biotin-Carboxylcarrier-Protein und 0,15 mg Cytochrom c wurden auf einen linearen Saccharosegradienten von 5-20% in 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 aufgesetzt. Rotor SW 40 Ti, 39 000 U/Min. 5°C , Laufzeit 26 Stdn. Der Becher wurde von unten fraktioniert. Die durchgezogene Linie bedeutet Radioaktivität, die gestrichelte Linie Extinktion bei 410 mμ.

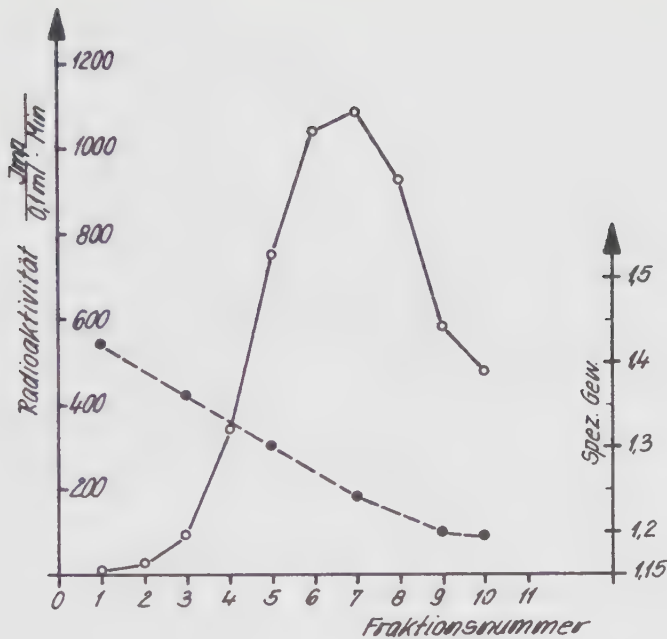


Abb. 16 Isopycnische Gradientenzentrifugation von ^{14}C -Biotin-Carboxylcarrier-Protein (27)

36 000 Imp/min des Biotin-Carboxylcarrier-Proteins nach Chromatographie an Sephadex G 75 (s. Anreicherung des Biotin-Carboxylcarrier-Proteins) wurden gleichmäßig in 5 ml eines linearen Gradienten von 0-4,5 M CsCl in 5 M Harnstoff verteilt. Die Lösung wurde 4 Tage und 19 Stdn. bei 25°C und 35 000 U/Min. im SW-39-Rotor zentrifugiert. Das spezifische Gewicht wurde durch Auswiegen von 0,1 ml Proben bestimmt. Die durchgezogene Linie bedeutet Radioaktivität, die gestrichelte Linie spezifisches Gewicht.

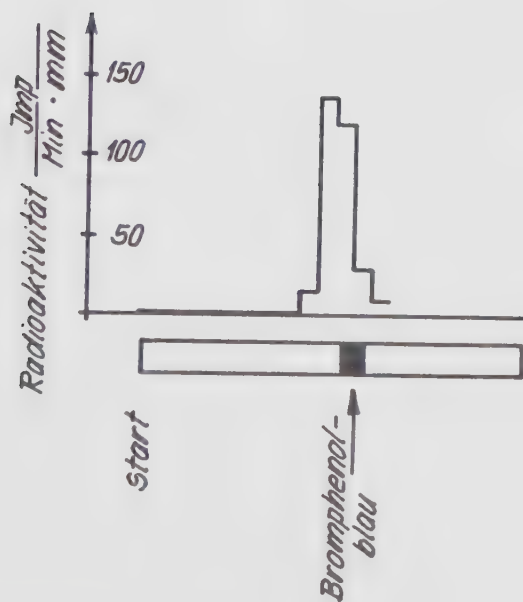
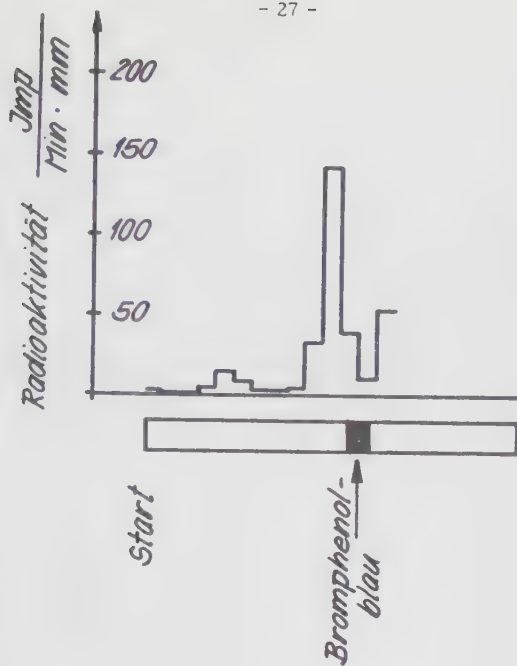
Abb. 17 Disk-Elektrophorese des mit Cyanat umgesetzten ^{14}C -Biotin-Carboxyl-carrier-Proteins in Natriumdodecylsulfat-Lösung →

Biotin-Carboxylcarrier-Protein (4200 Imp/min) nach der Chromatographie an Sephadex G 75 (s. Anreicherung) wurde in 0.2 ml über Nacht bei Raumtemperatur gegen 0.05 M KOCN-Lösung dialysiert, die mit K_2CO_3 auf pH 9.0 eingestellt worden war. Die Lösung wurde auf 0.13 ml konzentriert und dann auf ein 10proz. Acrylamid-Gel (0.27 % N.N'-Methylenbisacrylamid) nach Weber und Osborn (33,34) aufgesetzt. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur 7 Stdn. bei 25 V durchgeführt. Danach wurde das Gel sofort in Scheiben geschnitten und die Radioaktivität bestimmt. Möglicherweise wurde unter den Reaktionsbedingungen etwas Biotin abgespalten, das dann der Markierungsbande vorauswanderte.

Abb. 18 Disk-Elektrophorese des in Natriumdodecylsulfat-Lösung erhitzten ^{14}C -Biotin-Carboxylcarrier-Proteins →

Biotin-Carboxylcarrier-Protein (3000 Imp/min) nach der Chromatographie an Sephadex G 75 (s. Anreicherung) wurde 2 Stdn. bei 80°C in 2proz. Natriumdodecylsulfat-Lösung gehalten. Die Lösung wurde auf ein 10proz. Acrylamid-Gel (0.27 % N.N'-Methylenbisacrylamid) in 0.2% Natriumdodecylsulfat nach Weber und Osborn (33, 34) aufgesetzt.

Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur 7 Stdn. bei 25 V durchgeführt. Danach wurde das Gel sofort in Scheiben geschnitten und die Radioaktivität bestimmt.



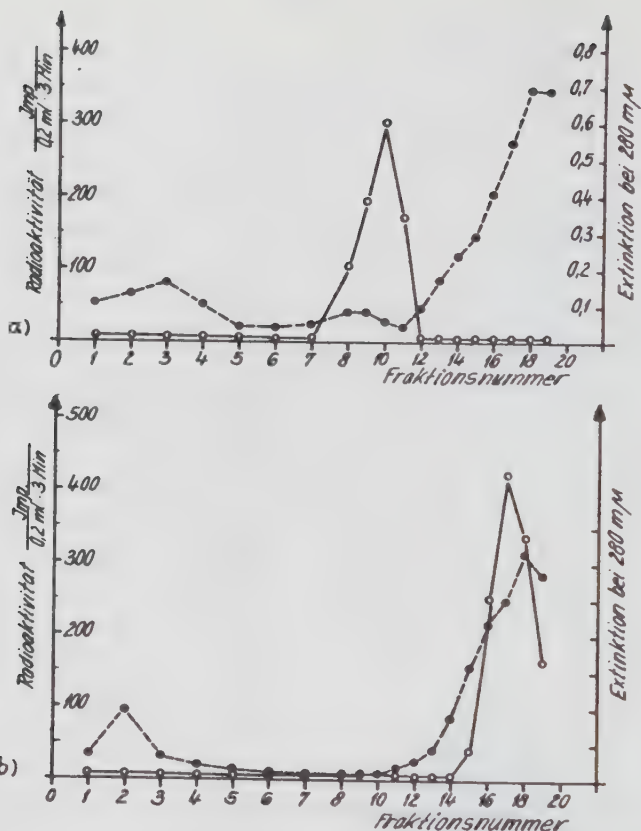


Abb. 19a Sedimentation des Avidinkomplexes des ^{14}C -Biotin-Carboxylcarrier-Proteins im Saccharose-Gradienten

Abb. 19b Sedimentation des ^{14}C -Biotin-Carboxylcarrier-Proteins ohne Avidin

2 ml Rohextrakt aus *Achromobacter* wurden tropfenweise mit 4 ml Aceton versetzt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und der Überstand mit dem Rotationsverdampfer auf 0.18 ml eingengt. Davon wurden 0.1 ml mit 0.5 mg Avidin versetzt (30, 31). Die restlichen 0.08 ml wurden in einem zweiten Becher als Referenz laufen gelassen.

Der Lauf wurde mit einem SW-40-Ti-Rotor bei 5°C in einem linearen Saccharosegradienten von 5-20% in 0.03 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.2 durchgeführt.

Laufzeit: 24 Stdn. Die Becher wurden von unten fraktioniert.

Die durchgezogene Linie bedeutet Radioaktivität, die gestrichelte Linie Extinktion bei 280 $\text{m}\mu$.

3. Zusammenfassung

Die Untersuchungen zeigen, daß auch in *Achromobacter* IVS ähnlich wie in *E. coli* und *Propionibacterium shermanii* ein Biotin-Carboxylcarrier-Protein existiert (3-7).

Unter den Bedingungen der Anreicherung liegt es in ungebundener Form vor. Während das Biotin-Carboxylcarrier-Protein aus *Propionibacterium shermanii* relativ fest in den Komplex der Methylmalonyl-CoA-Pyruvat-Transcarboxylase eingebaut ist, ist das in der *E. coli*-Acetyl-CoA-Carboxylase nur schwach gebunden. Schon unter den Bedingungen einer Gel-Adsorption wird es freigesetzt (35).

Das aus *Achromobacter* isolierte Biotin-Carboxylcarrier-Protein dürfte Bestandteil der Acetyl-CoA-Carboxylase sein. Züchtet man *Achromobacter* IVS nämlich in einem Medium, das nur Acetat als Kohlenstoffquelle enthält, so findet man als einziges Biotin-haltiges Protein nur noch das Biotin-Carboxylcarrier-Protein. Beim enzymatischen Test der Acetyl-CoA-Carboxylase wurden, wahrscheinlich wegen hoher Carbonanhydraseaktivität im Rohextrakt, keine reproduzierbaren Werte gefunden.

Die Molekulargewichte der drei Biotin-Carboxylcarrier-Proteine sind recht unterschiedlich, 22 000 für das aus *E. coli* (5-7), 11 700 für das aus *Propionibacterium shermanii* (3) und etwa 10 000 für das aus *Achromobacter*. Alle drei sind saure Proteine. Der isoelektrische Punkt des *E. coli*-Proteins liegt bei pH 4.5, der des *Achromobacter*-Proteins bei pH 4.45.

V. Dissoziation von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase und Reassoziaton der Untereinheiten zum aktiven Enzym

1. Einleitung

β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase ist das zweite Biotin-haltige Protein in *Achromobacter*, wenn das Zuchtmedium Isovaleriansäure als einzige Kohlenstoffquelle enthält. Da eine sehr gute Reinigungsmethode bereits ausgearbeitet war (36) bot sich die Möglichkeit, durch die Untersuchungen der Struktur des Enzymes eventuell weiteren Aufschluß über die Entwicklung der Biotinenzyme zu gewinnen. Die Untersuchung zweier Biotinenzyme aus dem gleichen Organismus bietet dabei besondere Vorteile. Liefße sich beispielsweise ein Biotin-Carboxylcarrier-Protein aus dem β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase-Komplex isolieren, so könnte man feststellen, ob es ein für den Organismus gemeinsames Biotin-Protein gibt. Es wäre auch sehr aufschlußreich, wenn sich die beiden "Bioton-Carrier" untereinander als sehr ähnlich erwiesen. Dies würde bedeuten, daß in *Achromobacter* ein frei diffundierendes Biotin-Carboxylcarrier-Protein über die entwicklungsgeschichtliche Trennung von *E. coli* bzw. *Propionibacterium* von *Achromobacter* hinaus, existierte.

Umgekehrt lassen auch große Strukturunterschiede verwandter Enzyme aus dem gleichen Organismus weitergehende Schlüsse zu: Solche Enzyme sollten dann beispielsweise verschieden reguliert werden oder Membran-gebunden bzw. frei diffundierend vorkommen. Da sich bekanntlich die gleichen Proteine aus verschiedenen Organismen teilweise recht erheblich unterscheiden, lassen sich solche Folgerungen nur bei Untersuchungen mit dem gleichen oder einem sehr ähnlichen Organismus ziehen.

2. Versuche zur Spaltung von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase in Untereinheiten

β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase wurde nach verschiedenen Methoden in Untereinheiten gespalten. Die freigesetzten Untereinheiten wurden durch Sedimentation im Saccharosegradienten nach Martin und Ames (26) oder durch Disk-Elektrophorese voneinander getrennt. Die Extinktion bei 280 m μ und die Radioaktivität der Fraktionen nach der Sedimentation wurden bestimmt. Man erhielt damit für jede Methode charakteristische "Spaltungsgebirge", die sich untereinander zum Teil aber stark ähnelten. Die kleinste Biotin-haltige Untereinheit sedimentierte im Bereich von 4.3 bis 5.7 S (korrigiert auf H₂O von 20°).

a) Spaltung in Harnstoff und Guanidin-Hydrochlorid

Mit 4 M Harnstoff ließ sich β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase bis zur radioaktiven Untereinheit um 5 S spalten. Abb. 20 zeigt eine Sedimentation im Saccharosegradienten in 4 M Harnstoff, Abb. 21 eine Sedimentation nach Entfernung des Harnstoffs.

Erhitzte man die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase in 6 M Harnstoff auf 80°C und sedimentierte sie dann im Saccharose-Gradienten, so wanderte die radioaktive Untereinheit etwas langsamer in einem etwas breiteren Gipfel (Abb. 22). Wahrscheinlich liegt sie nach dieser Behandlung in einer stärker aufgefalteten Form vor. Für diese Annahme und gegen das Auftreten einer neuen, kleineren Untereinheit spricht die Disk-Elektrophorese von ähnlich vorbehandelter β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase in Natriumdodecylsulfat-Lösung (Abb. 34).

Bei der Chromatographie an einer mit 4 M Guanidin-Hydrochlorid äquilibrierten Sephadex-G-200-Säule erschienen Radioaktivität und Extinktion bei 280 m μ , allerdings etwas voneinander getrennt, im Bereich der Ausschlußgrenze (Abb. 23).

Die Ausschlußgrenze für globuläre Proteine liegt beim Molekulargewicht 800 000, bei statistisch geknäuelten Proteinen kann sie allerdings erheblich niedriger sein (37).

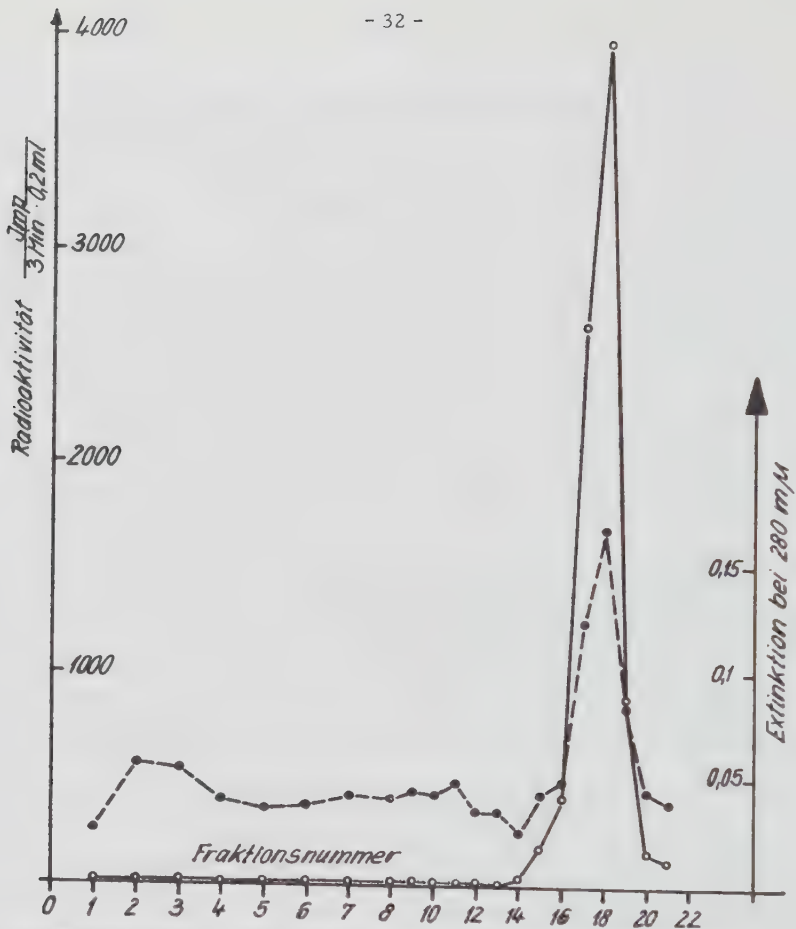


Abb. 20 Sedimentation von ^{14}C -Biotin-markierter β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase im Saccharosegradienten in 4 M Harnstoff

Eine Lösung von 0,23 mg (6000 Imp/min) β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase in 0,28 ml 4 M Harnstoff und 0,05 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 wurde 2 Stdn. bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann auf einen linearen Saccharosegradienten von 5 bis 20% in einer 4 M Harnstoff-Lösung in 3 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 aufgesetzt.

Rotor SW 40 Ti, Laufzeit 22 Stdn., 20 Min., 5°C

Der Becher wurde von unten fraktioniert.

Die durchgezogene Linie bedeutet Radioaktivität, die gestrichelte Linie Extinktion bei 280 mμ.

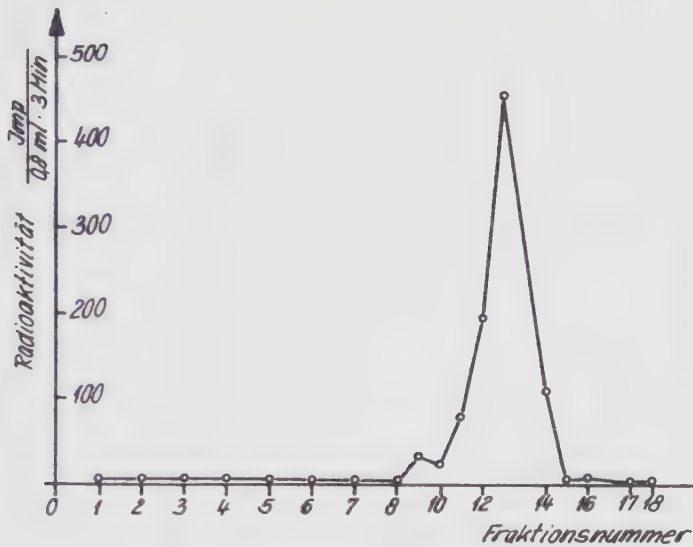


Abb. 21 Sedimentation von ^{14}C -Biotin-markierter β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase nach Spaltung mit Harnstoff, im Saccharosegradienten

β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase wurde in einer Konzentration von 0.26 mg/ml bei Raumtemperatur 3 Stdn. in einer Lösung von 6 M Harnstoff und 0.03 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 0.5 M Kalium-EDTA pH 9.75 gehalten. Die Lösung wurde mit H_2O auf 1/8 verdünnt; davon wurden 0.013 mg Protein auf einen linearen Saccharosegradienten von 5-20% in 0.01 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.2 aufgesetzt.

Rotor SW-40-Ti 39 000 U/Min. 5°C Laufzeit 21 Stdn.

Der Becher wurde von unten fraktioniert.

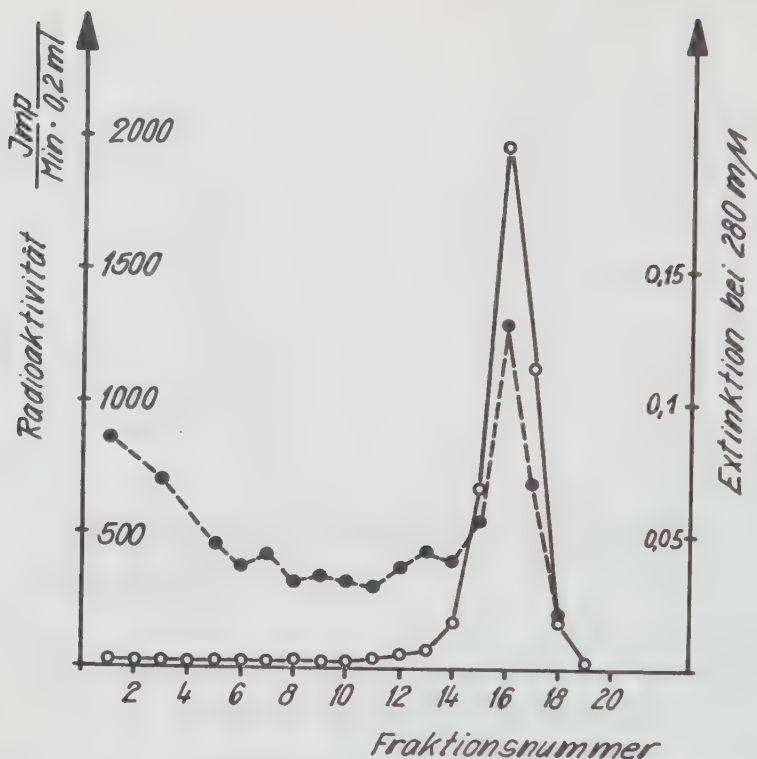


Abb. 22 Sedimentation im Saccharose-Gradienten von ^{14}C -Biotin-markierter β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase nach Erhitzen in 6 M Harnstoff

0,38 mg β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase wurden durch Erhitzen ausgefällt, mit H_2O gewaschen und mit 0,05 ml 6 M Harnstoff gelöst. Die Lösung wurde $1\frac{1}{2}$ Stdn. bei 80°C gehalten.

Nach dem Verdünnen mit 0,5 ml 1 mM Glycin/NaOH-Puffer pH 9,3 wurde sie auf einen 5-20proz. Saccharose-Gradienten in 1 mM Glycin/NaOH-Puffer pH 9,3 aufgesetzt.

Rotor SW-40-Ti, 39 000 U/Min., 5°C , Laufzeit 21 Stdn. 40 Min.

Der Becher wurde von unten fraktioniert.

Die durchgezogene Linie bedeutet Radioaktivität, die gestrichelte Linie Extinktion bei 280 $\text{m}\mu$.

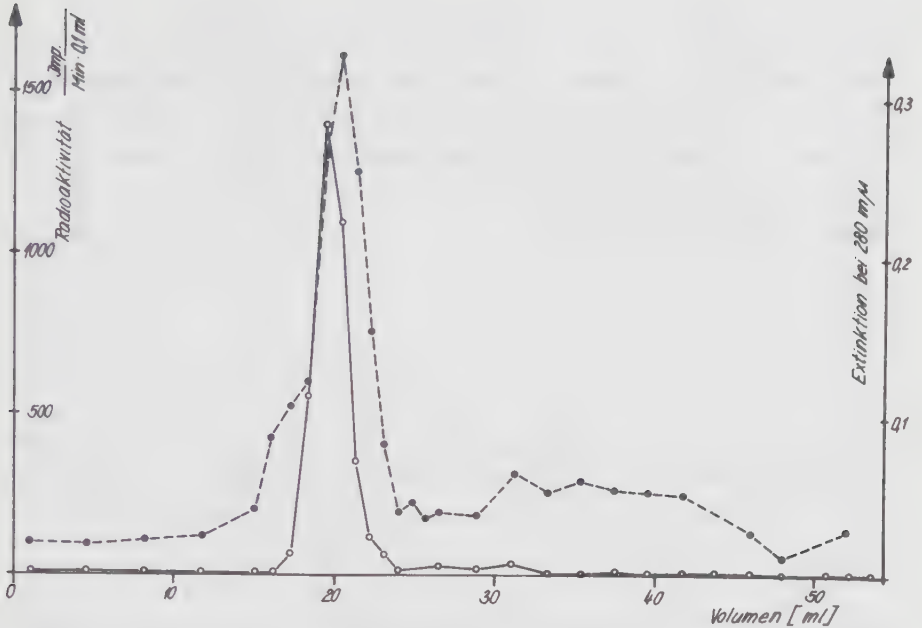


Abb. 23 Chromatographie von ^{14}C -Biotin-markierter β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase an einer mit 4 M Guanidin-Hydrochlorid äquilibrierten Sephadex-G-200-Säule

1.9 mg (50 000 Imp/min) β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase wurden bei Raumtemperatur in 4 M Guanidin-Hydrochlorid-Lösung zwischen pH 8.3 und 8.7 mit 20 μMol Dithiothreitol umgesetzt (38). Nach 4 Stdn. 15 Min. wurden 320 μMol Äthylenimin zugesetzt (39-41); der pH-Wert verschob sich dabei auf 9.5. Der Ansatz (1.3 ml) wurde auf eine Sephadex-G-200-Säule (95 x 1 cm) aufgesetzt, die mit 5 M Guanidin-Hydrochlorid in 0.05 M Tris/HCl-Puffer pH 9.1 äquilibriert war.

Die durchgezogene Linie bedeutet Radioaktivität, die gestrichelte Linie Extinktion bei 280 $m\mu$.

b) Spaltung durch Einfrieren und Auftauen in 0.5 M LiCl-Lösung

Nach dreimaligem Einfrieren mit Trockeneis und Auftauen bei Raumtemperatur sedimentierte die kleinste radioaktive Untereinheit des Spaltgemisches wiederum im Bereich von 5 S (Abb. 24). Enthält der Spaltansatz zusätzlich noch 0.3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, so wird die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase möglicherweise überhaupt nicht gespalten. Während mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100% der Enzymaktivität wieder gefunden wurde, zeigte sich ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ keine Aktivität mehr.


Abb. 24 a Sedimentation im Saccharose-Gradienten der durch dreimaliges Einfrieren mit Trockeneis und Auftauen bei Raumtemperatur gespaltenen ^{14}C -Biotin- β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase.

Abb. 24 b Sedimentation eines gleich zusammengesetzten Ansatzes, der nicht eingefroren und aufgetaut wurde

Der Ansatz enthielt 1.0 mg (3.3 mg/ml) Enzym in einer Lösung von 0.5 M LiCl und 0.02 % NaN_3 in 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.2.

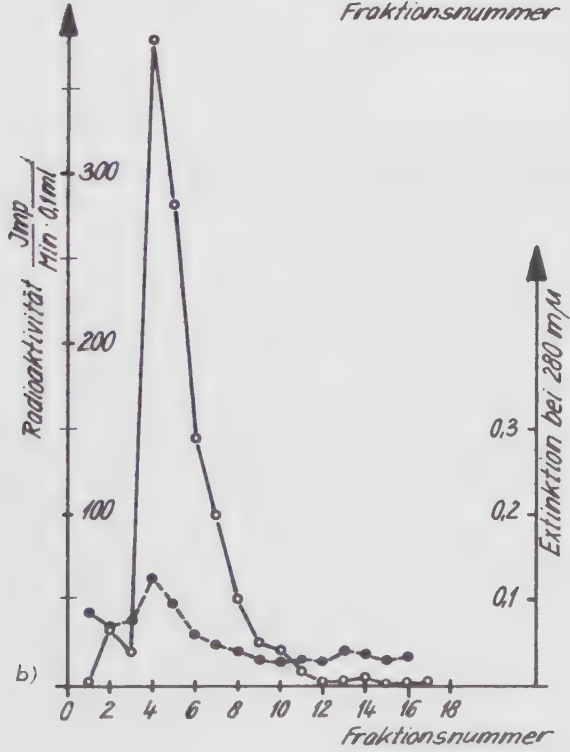
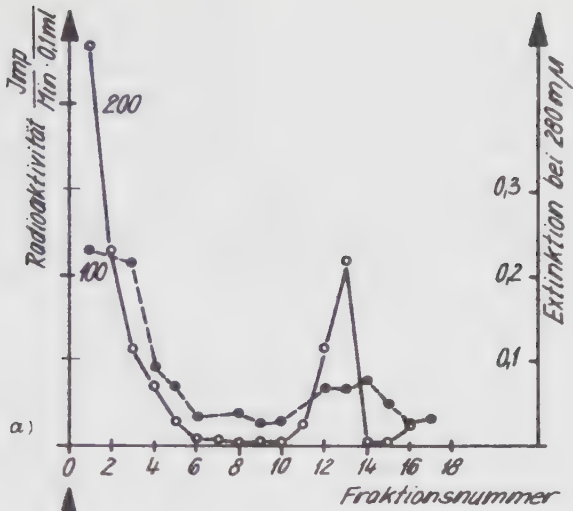
Das Enzym war zunächst über eine Sephadex-G-200-Säule chromatographiert worden, die mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.2 und 0.02% NaN_3 äquilibriert war und wurde dann für den Versuch eingefroren aufbewahrt. Die Proben wurden auf einen 5-20proz. Saccharose-Gradienten in einer Lösung von 0.5 M LiCl und 0.02% NaN_3 in 5 mM Kaliumphosphatpuffer, aufgesetzt.

Rotor SW-40-Ti, 39 000 U/Min., Laufzeit 20 Stdn. bei 5°C.

Die Becher wurden von unten fraktioniert.

Die durchgezogene Linie bedeutet Radioaktivität, die gestrichelte Linie Extinktion bei 280 m μ .

Die hohe Radioaktivität am Boden des Gradientenbechers der obigen Sedimentation dürfte auf ausgefallenes Protein zurückzuführen sein.



c) Spaltung von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase in Ameisensäure

Obwohl β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase im Säuren ausfällt, läßt sich das Enzym (auch als denaturierter Niederschlag) in reiner Ameisensäure lösen. Rührt man diese Lösung in H_2O ein, so bleibt das Enzym meist in Lösung. Da Proteine unter diesen Bedingungen fast ausschließlich positive Ladungen tragen, kann man erwarten, daß sich die Untereinheiten wegen der elektrostatischen Abstoßung voneinander trennen. Der Hauptgipfel der Biotin-haltigen Untereinheit sedimentierte mit 10,5 S (Abb. 25).

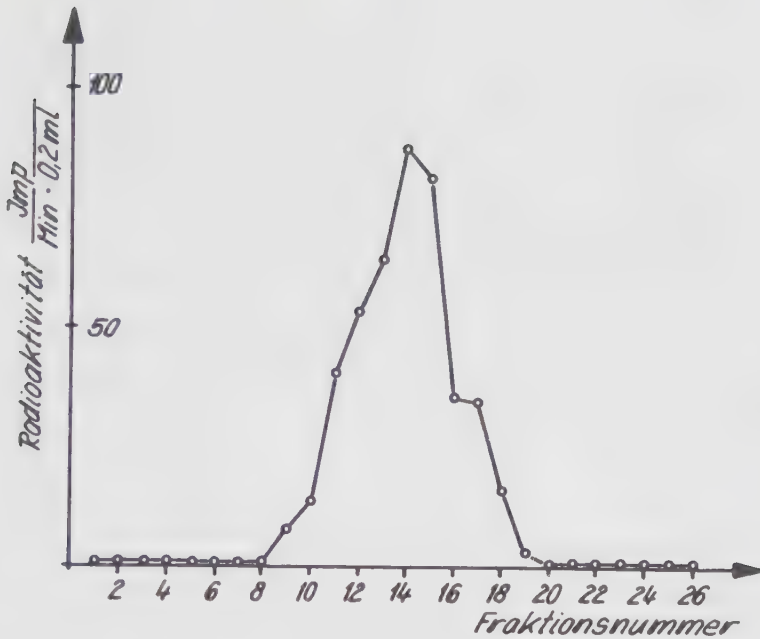


Abb. 25 Sedimentation von ^{14}C -Biotin-markierter β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase nach Spaltung in Ameisensäure

0.24 mg β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase in 0.03 M Kaliumphosphatpuffer wurden gefriergetrocknet und in 0.05 ml Ameisensäure gelöst. Die Lösung wurde in 0.25 ml H_2O eingerührt und auf einem linearen Saccharosegradienten von 5-20% in 20% (v/v) Ameisensäure aufgesetzt.

Rotor SW-40-Ti, 39 000 U/Min., 5°C , Laufzeit 21 Stdn. 40 Min.

Der Becher wurde von unten fraktioniert.

d) Spaltung von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase in stark verdünnten Alkali-Salzlösungen im Neutralen und Alkalischen

Bringt man das Enzym bei 4° in eine etwa 1-10 mM Alkalisalz- oder -pufferlösung, so spaltet es sich bei neutralem pH in etwa 1-3 Tagen teilweise in Untereinheiten (Abb. 26). Die Spaltungsgeschwindigkeit erwies sich als unabhängig davon, ob Li^+ , Na^+ , K^+ oder Cs^+ verwendet wurde. Sie ist jedoch sehr stark vom pH-Wert abhängig, wie Abb. 26 zeigt. Während im 5 mM Glycin/NaOH-Puffer pH 9,35 das Enzym im wesentlichen in Untereinheiten im Bereich um 5 S zerfallen war, war der größere Teil einer gleichartigen Enzymprobe in 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 noch ungespalten.

Zur Spaltung möglicher Disulfidbrücken wurde einem alkalischen Parallel-Spaltansatz Dithioerythritol bis zur 26 mM Lösung zugesetzt. Es ließ sich jedoch keine kleinere radioaktive Untereinheit gewinnen.

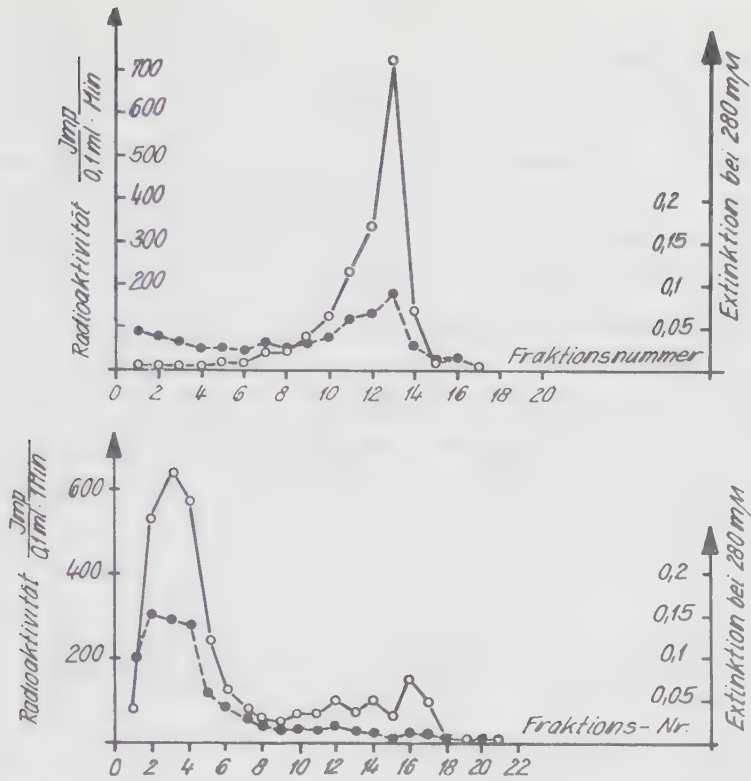


Abb. 26a Sedimentation im Saccharose-Gradienten von ^{14}C -Biotin-markierter β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase nach Dialyse gegen 5 mM Glycin/NaOH-Puffer pH 9,35

Abb. 26b Referenzversuch nach Dialyse gegen 9 mM NaCl in 5 mM Kaliumphosphat-puffer pH 7,0

Je 0,43 mg β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (2,2 mg/ml) wurden 69 Stdn. bei 4°C gegen 5 mM Glycin/NaOH-Puffer pH 9,35 bzw. 9 mM NaCl in 5 mM Kaliumphosphat-puffer pH 7,0 dialysiert. Es wurden Saccharose-Gradienten in der jeweiligen Dialysen-flüssigkeit verwendet.

Rotor SW-40-Ti, 39 000 U/Min., 5°C , Laufzeit 23 Stdn.

Die Becher wurden von unten fraktioniert.

Die durchgezogene Linie bedeutet Radioaktivität, die gestrichelte Linie

Extinktion bei 280 m μ

Hemmung der Spaltung von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase in stark verdünnten Salzlösungen in Gegenwart von Mg^{++}

Ersetzt man unter sonst gleichen Bedingungen des neutralen Spaltversuchs das Alkali-Ion durch Mg^{++} in der gleichen Ionenstärke, so wird die Spaltung stark gehemmt.

Abb. 27 zeigt die Spaltungsergebnisse in 3 mM bzw. 1 mM $MgCl_2$ -Lösung. Im unteren Teil der Abbildung ist als Referenz die Spaltung in NaCl-Lösung zu sehen.

Die stabilisierende Wirkung des Mg^{++} dürfte auf eine spezifische Wechselwirkung mit dem Enzym zurückzuführen sein. Bei einer unspezifischen Wechselwirkung sollte man einen Effekt erst bei höheren Mg^{++} -Konzentrationen erwarten. Man kann sich vorstellen, daß das Mg^{++} an bestimmten Stellen der Oberfläche des Enzyms gebunden wird und damit diejenige Konformation der Untereinheiten stabilisiert, die zur Zusammenlagerung zum Gesamtkomplex besonders günstig ist.

Abb. 27 a Sedimentation im Saccharose-Gradienten von ^{14}C -Biotin-markierter β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase nach Dialyse gegen 3 mM $MgCl_2$

Abb. 27 b Sedimentation im Saccharose-Gradienten von ^{14}C -Biotin-markierter β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase nach Dialyse gegen 1 mM $MgCl_2$

Abb. 27 c Referenz-Versuch nach Dialyse gegen 9 mM NaCl

Je 0.43 mg β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (2.2 mg/ml) wurden 69 Stdn. bei $4^{\circ}C$ gegen 3 mM $MgCl_2$ 1mM $MgCl_2$ bzw. 9 mM NaCl jeweils in 5 mM Kaliumphosphat-puffer pH 7.0, dialysiert. Es wurden Saccharosegradienten in der jeweiligen Dialysenflüssigkeit verwendet. Rotor SW-40-Ti 39 000 U/Min., $5^{\circ}C$, Laufzeit 23 Stdn.

Die Becher wurden von unten fraktioniert.

Die durchgezogene Linie bedeutet Radioaktivität, die gestrichelte Linie Extinktion bei 280 $m\mu$.

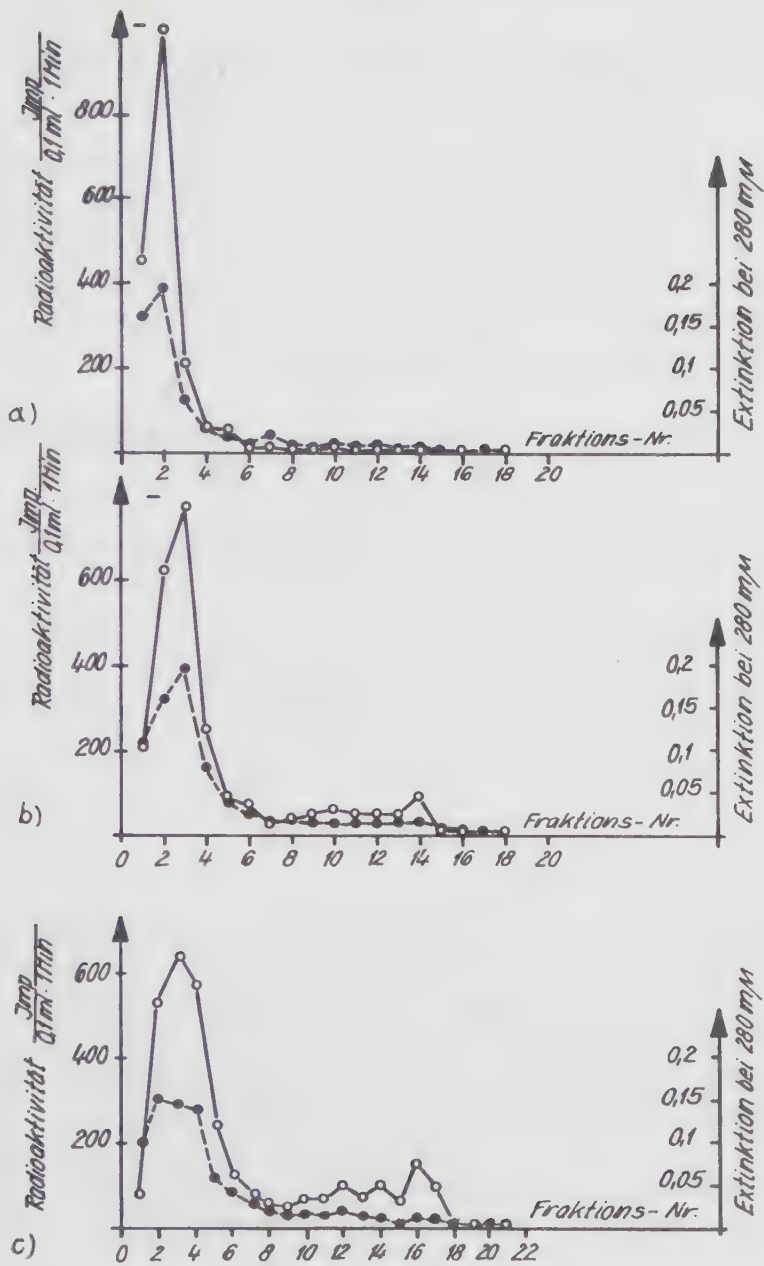


Abb. 28 Disk-Elektrophorese von ^{14}C -Biotin-markierter β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase bei pH 9.8

0.61 mg (15 000 Imp/min) β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase in 0.05 ml wurden mit 0.15 ml 0.01 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9.8 versetzt, der mit Diäthylpyrocarbonat gesättigt war. Die Lösung wurde über Nacht bei 4°C gegen 0.01 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9.8 dialysiert. Davon wurden 0.06 mg Protein auf ein 7.5proz. Acrylamidgel (0.2 % N.N'-Methylenbisacrylamid) in 0.01 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9.8 aufgesetzt.

Elektrophorese bei 300 V, 4°C , Laufzeit 3 Stdn. 25 Min.

Abb. 29 Disk-Elektrophorese von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase die 2 Tage in einer 0.01 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung bei pH 9.8 gehalten wurde

0.016 mg β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (10.5 mg/ml), die in 0.7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 0.03 M Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7.2 aufbewahrt worden war, wurde mit 0.01 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9.8 auf das 70fache verdünnt und 2 Tage bei 4°C gehalten. Danach wurden noch 91% der ursprünglichen enzymatischen Aktivität gefunden. Die Disk-Elektrophorese wurde in einem Gel durchgeführt, das 7.1% Acrylamid und 0.19% N.N'-Methylenbisacrylamid in 0.01 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9.8 enthielt.

Elektrophorese bei 350 V, Laufzeit 2 Stdn. 5 Min., bei 4°C .

Disk-Elektrophorese bei pH 9.8

Da die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase bei pH 9.3 in niedriger Salzkonzentration weitgehend in Untereinheiten im Bereich um 5 S zerfiel (Abb. 26), sollte möglicherweise eine Disk-Elektrophorese unter ähnlichen Bedingungen Aufschluß über die Anzahl der Untereinheiten geben. Wie Abb. 28 zeigt, wurden zwei nahe beieinander liegende intensive Banden gefunden, die von einigen schwächeren gefolgt wurden. Die erste Bande war radioaktiv, in der zweiten fand sich keine Radioaktivität. In manchen Versuchen fielen die beiden Banden auch zusammen. Möglicherweise ist dies auf die Sterilisierung mit Diäthylpyrocarbonat (42) zurückzuführen, wobei wahrscheinlich von Fall zu Fall mehr oder weniger positive Ladungen am Enzym neutralisiert werden.

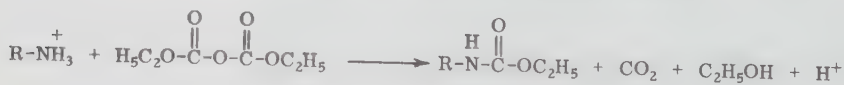


Abb. 28

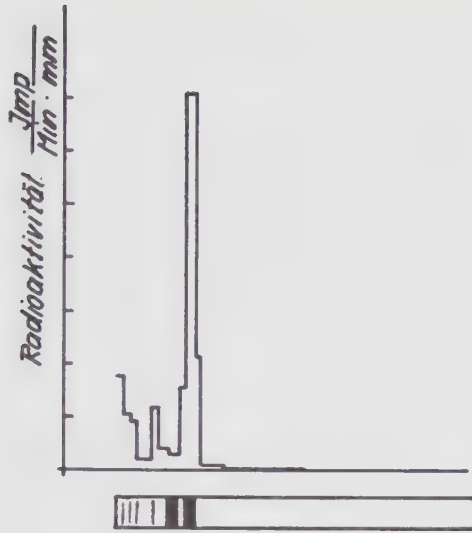


Abb. 29



Abb. 30



Abb. 30 Disk-Elektrophorese von "(NH₄)₂SO₄-stabilisierter" β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase in 3.75proz. Acrylamidgel

0.03 mg β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase, die in 0.7 M (NH₄)₂SO₄ aufbewahrt worden war, wurden in einer Lösung von 0.03 M (NH₄)₂SO₄ in 2.2 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7.2 auf ein Gel nach Maurer System 4 (3.75 % Acrylamid 0.1 % N.N'-Methylenbisacrylamid, pH 9.5) aufgesetzt.

Elektrophorese bei 300 V, Laufzeit 5 Stdn. 40 Min., 4°C.

e) Spaltung mit Natrium-Dodecylsulfat und Trimethylcetylammoniumbromid

Bestimmung des Molekulargewichts der beiden Untereinheiten

Die in Dodecylsulfatlösung frei gewordenen Untereinheiten der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase wurden durch Disk-Elektrophorese nach Weber und Osborn (33, 34) getrennt. Dabei ließ sich direkt das Molekulargewicht der einzelnen Untereinheiten bestimmen (Abb. 32). Die kleinste Untereinheit hatte danach ein Molekulargewicht um 78 000; sie war nicht radioaktiv. Die nächst größere Untereinheit war radioaktiv; sie hatte ein Molekulargewicht um 96 000. Diese beiden waren die Hauptbanden der Spaltung (Abb. 31). Bei wesentlich geringeren Mengen an aufgesetztem Protein erschienen praktisch nur noch diese beiden Banden (Abb. 31).

Nimmt man an, daß die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase aus je vier der beiden Untereinheiten aufgebaut ist, so ergäbe sich ein Molekulargewicht von etwa 700 000. Mit dem von Apitz, Rehn und Lynen (36) durch analytische Ultrazentrifugation bestimmten Wert von 760 000 bzw. 700 000 (wenn man von dem aus der Aminosäurezusammensetzung abgeleiteten spez. Gewicht ausgeht), stimmt dieses Molekulargewicht recht gut überein.

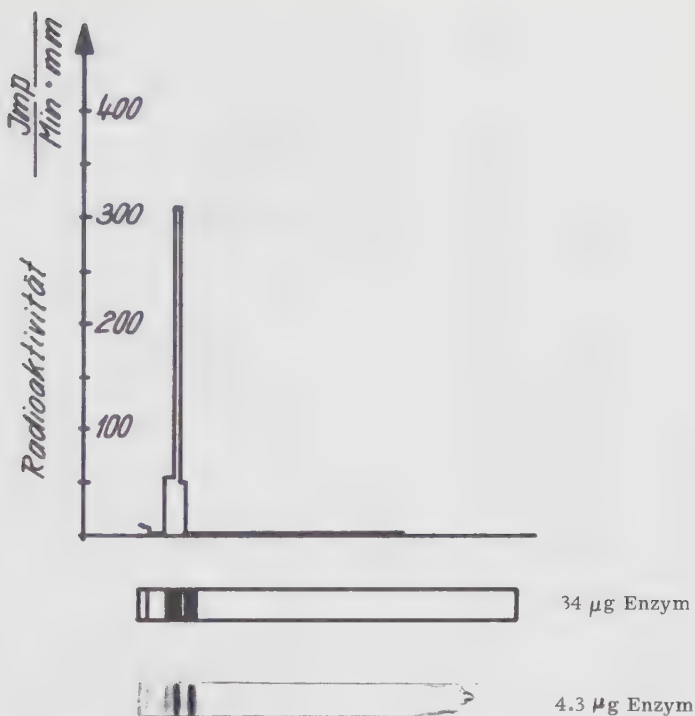


Abb. 31 Natrium-Dodecylsulfat-Disk-Elektrophoresen von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase

Eine Lösung von 0.21 mg/ml β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase wurde nach 2tägiger Dialyse gegen 10 mM Cystein in 10 mM Glycin/NaOH-Puffer pH 9.8 mit Natrium-Dodecylsulfat bis zur 0.2proz. Lösung versetzt und 10 Min. bei 80°C gehalten. Es wurden 34 bzw. 4.3 µg Enzym auf ein 10proz. Acrylamid-Gel (0.27% N.N'-Methylenbisacrylamid) nach Weber und Osborn aufgetragen (33, 34). Die Elektrophorese wurde bei 52 V durchgeführt, sie dauerte 5 Stdn.

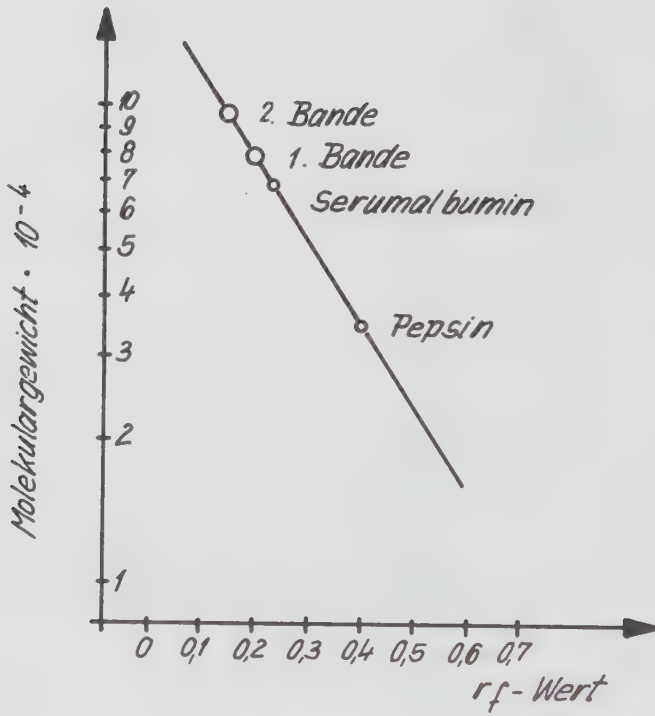


Abb. 32 Molekulargewichtsbestimmung der beiden Untereinheiten von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase durch Disk-Elektrophorese in Natrium-Dodecylsulfat-Lösung.

Die Eichgerade wurde mit den r_f -Werten von Pepsin und Serumalbumin festgelegt.

Sedimentierte man β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase nach Behandlung mit Natrium-Dodecylsulfat in stark verdünnter Salzlösung, so wanderte die radioaktive Untereinheit etwas langsamer in einem etwas breiteren Gipfel (Abb. 33).

Ähnlich wie beim Erhitzen in Harnstoff (Abb. 22) dürfte dies auf eine stärkere Auffaltung der Untereinheit zurückzuführen sein. Mit Trimethylcetylammonium-Bromid wurde dieser Effekt trotz Erhitzen nicht beobachtet. Der radioaktive Gipfel sedimentierte ähnlich wie bei der Spaltung durch Einfrieren und Auftauen in LiCl oder bei der Spaltung im Alkalischen (Abb. 24, 26).

Die Untersuchungen des "freien" Biotin-Carboxylcarrier-Proteins hatten gezeigt, daß es nach der Umsetzung mit Cyanat und anschließender Behandlung mit Natrium-Dodecylsulfat oder auch direkt nach dem Erhitzen in Natrium-Dodecylsulfat-Lösung mit dem Gemisch von 46 ml Eisessig und 454 ml 50% Methanol, dem Lösungsmittel des Farbstoffs zum Anfärben der Disk-Gele nicht mehr ausgefällt wurde. Gradientenläufe von ^{14}C -Biotin-markierter β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase nach Spaltung mit Natrium-Dodecylsulfat (Abb. 33) oder durch Erhitzen in Harnstofflösung (Abb. 22) hatten andererseits eine Radioaktivitätsverteilung ergeben aus der sich eine noch kleinere radioaktive Untereinheit nicht von vornherein ausschließen ließ. β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase wurde deshalb durch Erhitzen in Harnstoff in Untereinheiten gespalten und die Spaltansätze einer Disk-Elektrophorese in Natrium-Dodecylsulfat-Lösung unterworfen. Das Gel wurde dann ohne vorheriges Anfärben auf Radioaktivität untersucht (Abb. 34). Es wurde auch unter diesen Bedingungen keine kleinere radioaktive Untereinheit gefunden. Das veränderte Sedimentationsverhalten sollte also auf eine stärkere Auffaltung der Biotin-Untereinheit zurückzuführen sein.

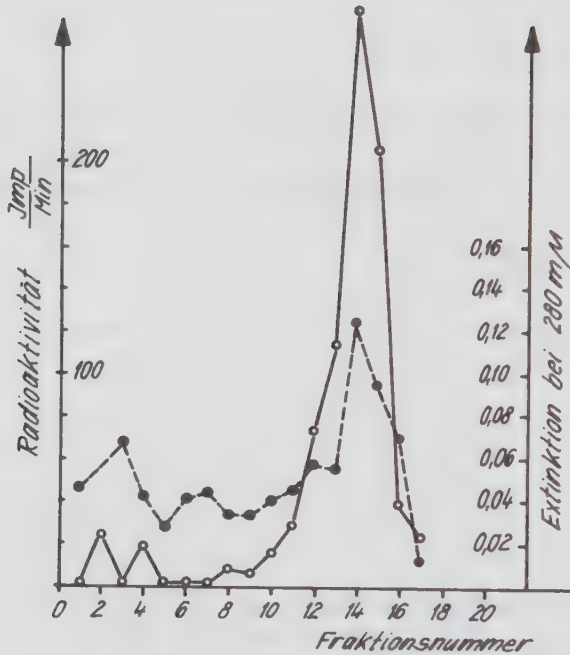


Abb. 33 Sedimentation im Saccharosegradienten von ^{14}C -Biotin-markierter β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase nach Spaltung mit Natrium-Dodecylsulfat

0.48 mg β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase in 0.3 ml 5 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 7.0 wurden bei Raumtemperatur mit 2.6 mg Natrium-Dodecylsulfat versetzt und anschließend bei 5°C in einem Saccharose-Gradienten in 0.85proz. Natrium-Dodecylsulfat-Lösung in 5 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 7.0 sedimentiert.

Rotor SW-40-Ti, 39 000 U/Min., Laufzeit 15 Stn. 35 Min.

Der Becher wurde von unten fraktioniert.

Die durchgezogene Linie bedeutet Radioaktivität, die gestrichelte Linie Extinktion bei 280 mμ.

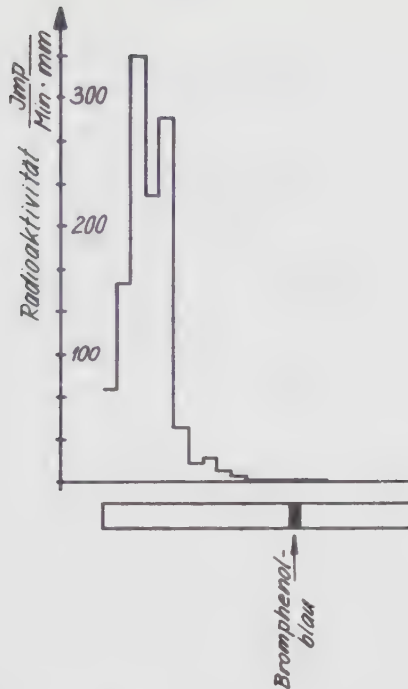


Abb. 34 Disk-Elektrophorese von ^{14}C -Biotin-markierter β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase nach Erhitzen in 6 M Harnstoff

0.21 mg β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase wurden durch Erhitzen ausgefällt und mit H_2O gewaschen. Der Niederschlag wurde mit 0.1 ml 6 M Harnstoff in 5 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 7.2 aufgelöst und 1 Stde. bei 80°C gehalten. Dann wurde der pH-Wert mit 0.1 M Glycin/NaOH-Puffer auf 9.3 gebracht und das Enzym 2 Stdn. bei 50°C mit 0.327 mg Dithiothreitol (38) reduziert. Zur Blockierung der freien SH-Gruppen wurde der Ansatz $\frac{1}{2}$ Stde. bei Raumtemperatur mit 0.185 mg Äthylenimin (39-41) umgesetzt. Anschließend wurde Dodecylsulfat bis zur 0.2proz. Lösung zugegeben und das Enzym auf ein 10proz. Acrylamid-Gel (0.27% N,N'-Methylenbisacrylamid) umgesetzt, das 6 M Harnstoff und 0.2% Dodecylsulfat in 5 mM Glycin/NaOH Puffer pH 9.3 enthielt.

Die Elektrophorese wurde bei 130 V bei Raumtemperatur durchgeführt; sie dauerte 1 Stde. 10 Min. Das Gel wurde anschließend sofort in Scheiben geschnitten und die Radioaktivität bestimmt.

3. Reassoziation der Untereinheiten von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase zum aktiven Enzym

Die Versuche zur Spaltung von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase hatten gezeigt, daß sich das Enzym unter relativ schonenden Bedingungen in zwei verschiedene Untereinheiten vom Molekulargewicht um 78 000 bzw. 96 000 spalten ließ. Im Saccharosegradienten sedimentierten diese Untereinheiten wie globuläre Proteine des gleichen Molekulargewichtsbereichs. Dabei schien die kleinere, die Biotin-freie Untereinheit teilweise zu assoziieren. Die Untereinheiten sollten also noch in einer relativ kompakten, für die Reassoziation günstigen Form vorliegen.

Nach 1-3tägiger Dialyse gegen 10 mM Glycin/NaOH-Puffer pH 9.8 ist β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase vollständig in Untereinheiten gespalten. Man findet in einem solchen Ansatz keine enzymatische Aktivität, auch wenn man den pH-Wert mit Phosphatpuffer auf 7 bringt und MgCl_2 und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zusetzt. Entweder wurde unter diesen Bedingungen ein niedermolekularer Bestandteil des Enzyms entfernt, der anschließend nicht mehr zugesetzt wurde oder die Untereinheiten wurden oxydiert.

Es zeigte sich, daß die zweite Annahme zutrifft. Führt man nämlich die gleiche Spaltung in Gegenwart von 10 mM Cystein unter Stickstoff durch, so zeigte sich anschließend enzymatische Aktivität. Es ergaben sich beim Test die für eine Reassoziierung typischen Anlaufkurven, wenn der Spaltansatz direkt eingesetzt wurde (Abb.35). β -Methylcrotonyl-CoA scheint die Reassoziierung besonders zu begünstigen.

Um zu zeigen, daß die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase unter den angewendeten Bedingungen tatsächlich gespalten wurde, wurde der Spaltansatz in einem Saccharose-Gradienten in einer Lösung von 30 mM Cystein in 10 mM Glycin/NaOH-Puffer pH 9.8 sedimentiert (s. Expt. Teil) (Abb. 36). In die einzelnen Fraktionsgläser wurde 0.05 M Kalium-Phosphatpuffer pH 6.3 vorgelegt. Das Enzym war in der üblichen Weise völlig gespalten worden. Die Hauptfraktion des radioaktiven Gipfels zeigte enzymatische Aktivität; dieses Mal jedoch nicht in einer Anlaufkurve. Offensichtlich hatten sich die Untereinheiten beim neutralen pH-Wert bereits assoziiert. Dies konnte mit einer anschließenden Sedimentation des radioaktiven Gipfels in einem Saccharose-Gradienten in einer Lösung von 30 mM Cystein in 0.03 M Kalium-Phosphatpuffer pH 7.2 bestätigt werden. Es ergab sich eine völlig andere Radioaktivitätsverteilung als beim vorhergehenden Gradientenlauf. Etwa die Hälfte der Biotin-haltigen Untereinheit war wieder assoziiert (Abb. 36).

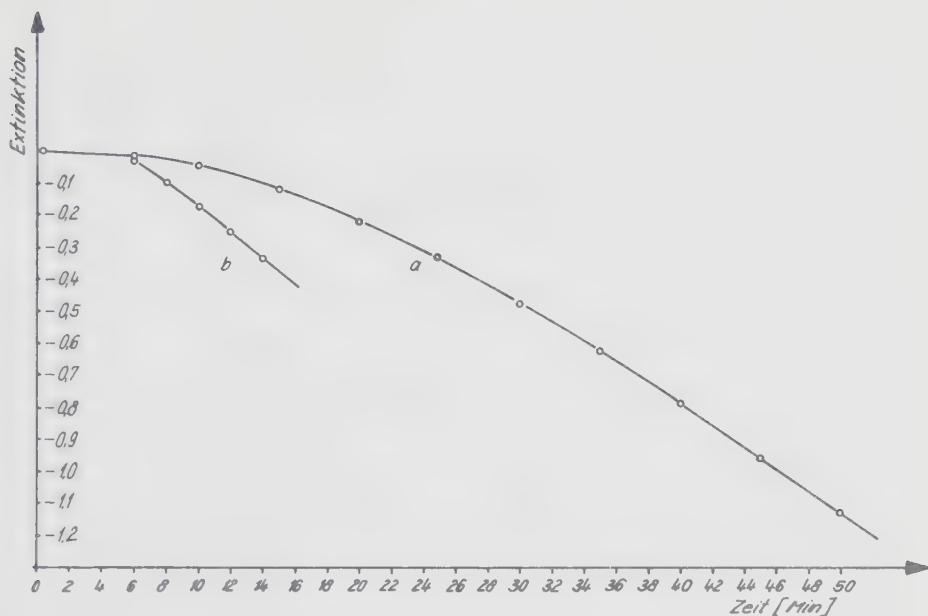


Abb. 35 Enzymatischer Test von gespaltener β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase

a) Start mit Enzym + Acetyl-CoA

b) Start mit Enzym + β -Methylcrotonyl-CoA

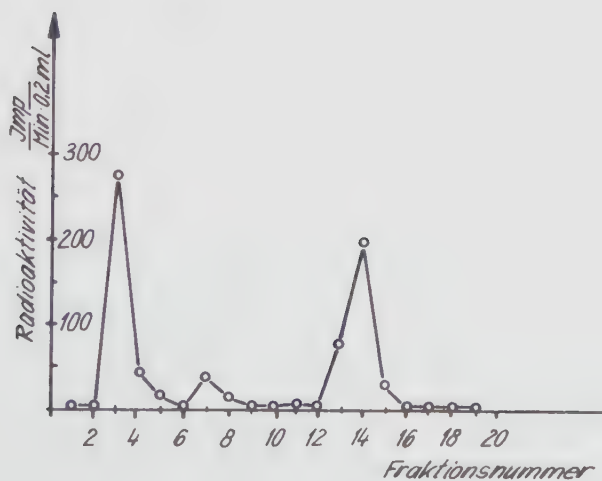
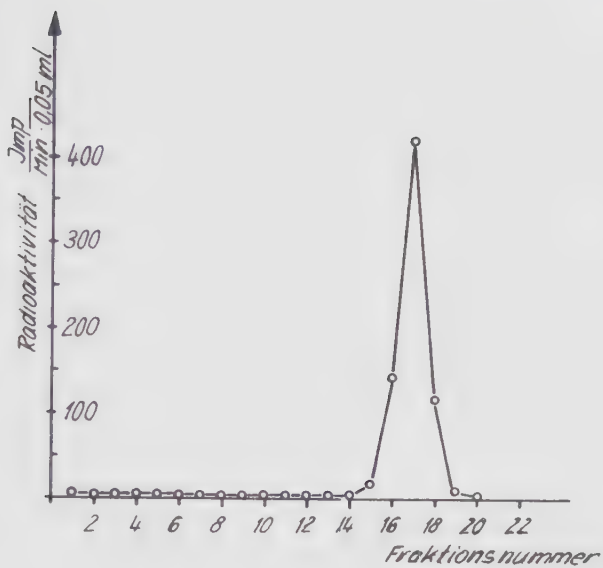
1.1 mg β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase in 0.7 ml Lösung wurden durch zweitägige Dialyse unter Stickstoff bei 4°C gegen 10 mM Cystein in 10 mM Glycin/NaOH-Puffer pH 9.8 gespalten (s. expt. Teil). Davon wurde ein Teil zur Kontrolle im Saccharose-Gradienten sedimentiert. Der enzymatische Test mit 0.08 mg Enzym wurde in der üblichen Weise durchgeführt, jedoch wurde mit dem gespaltenen Enzym gestartet, das einmal mit 10 mM Acetyl-CoA, einmal mit 10 mM β -Methylcrotonyl-CoA in 10 mM $MgCl_2$ bei Raumtemperatur 20 Min. bei pH 8.0 gehalten worden war. Im Falle der Inkubationsmischung mit Acetyl-CoA enthielt der Testansatz zusätzlich 0.1 μ Mol β -Methylcrotonyl-CoA.



Abb. 36 Dissoziation und Assoziation von ^{14}C -Biotin-markierter β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase

- a) Sedimentation von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase nach Spaltung im Alkalischen in Gegenwart von Cystein
- b) Sedimentation der Fraktion 17 des obigen Gradientenlaufs nach der Reaktivierung

0.8 mg β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase wurden unter Stickstoff bei 4°C 3 Tage gegen 10 mM Cystein in 10 mM Glycin-NaOH-Puffer pH 9.8 dialysiert. Der Spaltansatz wurde unter Varsol (einer bei $150\text{--}160^{\circ}\text{C}$ siedenden Erdölfraction) in einem Saccharose-Gradienten in 30 mM Cystein in 10 mM Glycin/NaOH-Puffer pH 9.8 sedimentiert. (Einzelheiten s. expt. Teil). Rotor SW-40-Ti, 39 000 U/Min. 5°C , 17 Std. 50 Min.. Der Gradient wurde anschließend in Reagenzgläsern fraktioniert, in die je 0.3 ml 30 mM Cystein in 50 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 6.3 vorgelegt wurden, wodurch sich dann ein pH-Wert von 7.5 einstellte. Unter diesen Bedingungen assoziierten sich die Untereinheiten teilweise wieder zum aktiven Enzym, wie durch eine weitere Sedimentation (Abb. 36 b) gezeigt wurde. Der Saccharose-Gradient in 30 mM Cystein in 30 mM Kalium-Phosphat pH 7.2 wurde in der oben beschriebenen Weise aufgebaut. Es wurde die Fraktion 17 des obigen Gradientenlaufs aufgesetzt nachdem sie 30 Min. bei Raumtemperatur und 7 Std. bei 4°C bei pH 7.5 gehalten wurde. Rotor SW-40-Ti, 39 000 U/Min. 5°C , 16 Std. 20 Min. Bezogen auf die Radioaktivität werden im neu entstandenen schnell sedimentierenden Gipfel 30-60% der ursprünglichen enzymatischen Aktivität wiedergefunden.



4. Zusammenfassung und Diskussion

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase aus zwei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut ist, die jeweils viermal im Komplex vorkommen dürften, einer Biotin-haltigen vom Molekulargewicht um 96 000 und einer ohne Biotin vom Molekulargewicht um 78 000. Die bereits früher (13) gefundene Zahl von vier Biotin-Molekülen pro Enzym findet damit in der Struktur des Komplexes ihre Entsprechung. Es gelang, die Untereinheiten zum aktiven Enzym zu reassoziieren, wenn man die Spaltung unter Stickstoff in Gegenwart von -SH-Verbindungen durchführte und wenn auch bei der Reassoziierung -SH-Verbindungen zugegen waren. Disulfidbrücken können also an der gegenseitigen Bindung der Untereinheiten nicht beteiligt sein. Die beiden Untereinheiten konnten nicht in kleinere Untereinheiten zerlegt werden. Es fand sich auch kein Biotin-Carboxylcarrier-Protein. Dies muß nicht bedeuten, daß die anfangs zitierte Hypothese eines in der Frühphase der Evolution allen Biotin-Enzymen gemeinsamen frei diffundierenden Biotin-Carboxylcarrier-Proteins falsch ist. Das Strukturgen des Biotin-Carboxylcarrier-Proteins kann im Laufe der Entwicklung in das Strukturgen eines der beiden Teilenzyme inkorporiert worden sein.

Bei der Züchtung von *Achromobacter* IVS in Isovaleriansäure Minimalmedium hatte sich gezeigt, daß die Bakterien bei zu starker Belüftung schlecht wuchsen. Möglicherweise hängt dies mit der großen Sauerstoffempfindlichkeit der Untereinheiten von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase zusammen. Bei hohem Sauerstoff-Partialdruck in der Zelle könnten die neu synthetisierten Untereinheiten oxydiert werden, noch bevor sie Gelegenheit haben, sich zum wesentlich weniger empfindlichen Komplex zusammenzulagern.

Einen Hinweis für diese Vermutung lieferte Gottlieb (43, 44). Er untersuchte die Wirkung von reinem Sauerstoff auf Agar-Kulturen von *Achromobacter* P 6, deren Medium jeweils nur eine Kohlenstoffquelle enthielt. Bei einer Reihe von Verbindungen wurde dabei das Wachstum gehemmt, bei anderen nicht. Die Ursache der Hemmung müßte damit bei den für den spezifischen Abbau der Verbindungen nötigen Enzymen liegen.

Die Reaktivierung der in Untereinheiten gespaltenen β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase wird durch β -Methylcrotonyl-CoA stark beschleunigt. Acetyl-CoA zeigt diese Wirkung nicht. Die Geschwindigkeit einer solchen Reassoziierung wird wesentlich davon bestimmt, in welchem Anteil die Untereinheiten in einer für die Zusammenlagerung günstigen Konformation vorliegen. Wird eine solche Konformation durch β -Methyl-

crotonyl-CoA stabilisiert, so müßte in dessen Gegenwart auch die Dissoziationskonstante des Enzymkomplexes kleiner sein. Von der Konzentration an β -Methylcrotonyl-CoA könnte dann wiederum die Abbaugeschwindigkeit des Enzyms abhängen. Je geringer die β -Methylcrotonyl-CoA-Konzentration wäre, desto größer wäre die Dissoziationskonstante und damit der Anteil an freien Untereinheiten und umso größer wäre dann auch die Angriffsfläche für Proteasen. Vielleicht liegt in einem solchen Mechanismus auch ein Grund für die Entwicklung von Enzymkomplexen, in denen das gleiche aktive Zentrum mehrmals vorkommt.

Interessant ist ein Strukturvergleich der β -Methylcrotonyl CoA-Carboxylase mit anderen Biotin-Enzymen. Abgesehen von der Mehrzahl der Acetyl-CoA-Carboxylasen (4, 45-54) haben die meisten der aus verschiedenen Organismen untersuchten Biotin-Enzyme (36, 55-67) ein Molekulargewicht zwischen 450 000 und 760 000 und besitzen vier Biotin-Moleküle pro Enzym. Im Detail zeigen sich jedoch charakteristische Unterschiede.

Abweichend vom vorherrschenden Schema besitzt die Methylmalonyl-CoA-Pyruvat-Transcarboxylase aus *Propionibacterium shermanii*, die im Arbeitskreis von H.G. Wood sehr genau untersucht wurde (3, 68-71) sechs Biotin-Moleküle pro Enzym. In der zentralen 12 S-Untereinheit des Komplexes liegen die aktiven Zentren der Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase. Die Untereinheit läßt sich in drei 6-S-Untereinheiten, diese wiederum mit drastischeren Mitteln in je zwei 2.5-S-Untereinheiten vom Molekulargewicht 60 000 spalten. Über eine relativ kleine Fläche ist die 12-S-Untereinheit mit drei 6-S-Untereinheiten verbunden. Diese Untereinheiten besitzen jeweils zwei aktive Zentren der Pyruvat-Carboxylase; sie lassen sich weiter in zwei 2.5-S-Untereinheiten vom Molekulargewicht 60 000 und zwei Biotin-Carboxylcarrier-Proteine zerlegen. Die Methylmalonyl-CoA-Pyruvat-Transcarboxylase muß also aus mindestens drei verschiedenen Polypeptidketten aufgebaut sein.

Nach unseren bisherigen Untersuchungen ist die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase dagegen nur aus zwei verschiedenen Polypeptidketten aufgebaut. Das Biotin ist nicht an ein besonderes Protein gebunden, sondern, wie wir inzwischen zeigen konnten, Bestandteil der Biotin-Carboxylase-Untereinheit.

Die beim Übergang vom Anaerobier *Propionibacterium* zum Aerobier *Achromobacter* auftretende Tendenz zur Zusammenfassung von Polypeptidketten scheint sich bei Biotin-Enzymen aus Hefe verstärkt fortgesetzt zu haben. Untersuchungen an Acetyl-CoA-Carboxylase und Pyruvat-Carboxylase aus Hefe deuten darauf hin, daß beide aktive Zentren von einer einzigen 6-S-Polypeptidkette gebildet werden (64).

Allerdings geht die Entwicklung nicht bei allen entsprechenden Eukaryonten-Enzymen so weit: Die kleinste Untereinheit der Propionyl CoA-Carboxylase aus Schweineherz sedimentiert mit 2.5 S (55), die kleinste Untereinheit der Pyruvat-Carboxylase aus Vogelleber hat ein Molekulargewicht von 45 000 (2.7 S) (62). Der wesentliche Unterschied zu den Bakterienenzymen scheint darin zu bestehen, daß die beiden Teilenzyme zu einer Einheit zusammengewachsen sind. Die 2.5 S bzw. 2.7 S-Untereinheiten werden nur unter vergleichsweise drastischen Spaltbedingungen freigesetzt. Viel leichter lassen sich die bekannten Biotin-Enzyme aus Tieren und Hefe (45-52, 55-65) dagegen bis zu den beide Teilenzyme enthaltenden Protomeren spalten. Ganz anders erfolgt die Spaltung bei den beiden Bakterien-Enzymen. Hier sind die beiden Teilenzyme und deren Polymere die im allgemeinen überwiegenden Spaltprodukte. Sehr anschaulich wird dieser Unterschied durch elektronenoptische Aufnahmen demonstriert. Bei der Vogelleber- und der Hefe-Pyruvat-Carboxylase sind die Protomeren deutlich als "Kugeln" sichtbar (1, 59, 61), während bei der Methylmalonyl-CoA-Pyruvat-Transcarboxylase aus *Propionibacterium* eine "Kugel" entweder durch zwei Pyruvat-Carboxylase-Untereinheiten oder sechs Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase-Untereinheiten gebildet wird (70).

All diesen Enzymen ist eine komplexe Struktur gemeinsam, in der jedes aktive Zentrum mehrmals vorkommt. Es ist deshalb erstaunlich, daß sich in *Achromobacter* ein Biotin-Carboxylcarrier-Protein findet, das nur schwach an andere Proteine assoziiert sein kann, umso mehr als ja das Biotin in β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase direkt an die Biotin-Carboxylase-Untereinheit gebunden ist.

Wir nehmen an, daß dieses Biotin-Carboxylcarrier-Protein Bestandteil der Acetyl-CoA-Carboxylase ist. Ähnlich schwach ist auch das Biotin-Carboxylcarrier-Protein der *E. coli*-Acetyl-CoA-Carboxylase an die beiden Teilenzyme gebunden (4-7, 72-78). Beim Vergleich mit den oben betrachteten Biotin-Enzymen muß man die *E. coli*-Acetyl-CoA-Carboxylase noch unter die Methylmalonyl-CoA-Pyruvat-Transcarboxylase aus *Propionibacterium* einstufen: In vitro entsteht ein relativ labiler Komplex aus einer Biotin-Carboxylase einem Biotin-Carboxylcarrier-Protein und einer Carboxyltransferase. Dies kommt dem angenommenen "Urzustand" der Biotinenzyme sehr nahe (Abb. 1), für den ein verschiedener Carboxyltransferasen gemeinsames Biotin-Carboxylcarrier-Protein angenommen wurde. Es muß einen besonderen Grund geben, daß die beiden Acetyl-CoA-Carboxylasen der allgemeinen Entwicklung der Biotinenzyme nicht gefolgt sind.

Möglicherweise sind diese Acetyl-CoA-Carboxylasen an die Membran gebunden und die Aktivität des Enzyms wird durch die Zusammensetzung der Membran gesteuert. Dies würde eine vom sphärischen Aufbau der oben betrachteten Enzyme abweichende Architektur erfordern. Vielleicht erfüllt ein teilweise frei diffundierendes Biotin-Carboxyl-carrier-Protein eine besondere regulatorische Funktion. Über Abbau und Neusynthese des Carrierproteins könnte die Acetyl-CoA-Carboxylase Aktivität auf der Ebene der Gene mit geringerem Energieaufwand gesteuert werden.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß die Enzyme eines Organismus, auch die einer Enzymfamilie, nicht auf der gleichen Entwicklungsstufe stehen müssen. Abhängig von ihrer Funktion sind sie einem verschieden starken, möglicherweise auch in verschiedene Richtung gehenden Selektionsdruck unterworfen. Die Parallele zur Entwicklung der Arten ist auffallend.

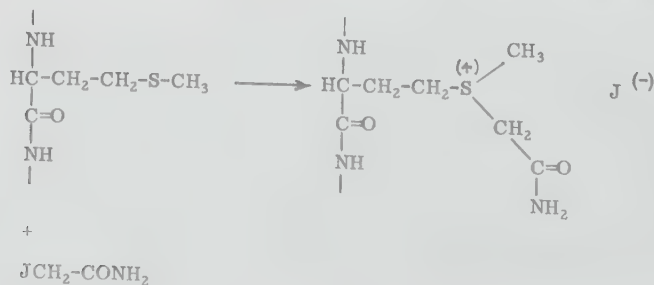
VI. Abtrennung von Biotinpeptiden aus einem Peptidgemisch durch Überführung des Biotins in das Sulfoniumsalz

1. Einleitung

Zur weiteren Untersuchung der Beziehungen der Biotinenzyme zueinander versuchten wir auch ihre Aminosäuresequenzen in der Umgebung des Biocytins zu vergleichen. Rominger und Lynen hatten gezeigt, daß Biotin-Apoenzym-Ligase aus Hefe, Biotin auch auf Apo-Methylmalonyl-CoA-Pyruvat-Transcarboxylase aus *Propionibacterium* übertragen kann (79, 80). In der Umgebung der Bindungsstelle des Biotins muß es also einen "Erkennungsbereich" geben, der für Biotin-Enzyme verschiedener Herkunft sehr ähnlich ist. Solche "essentiellen" Bereiche eignen sich sehr gut für phylogenetische Vergleiche. Aber nicht nur die Beziehungen der verschiedenen Organismen zueinander kann man dadurch bestimmen, es lassen sich auch die phylogenetischen Verwandtschaften der Biotin-Enzyme untereinander untersuchen.

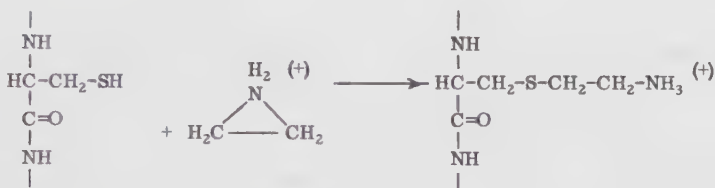
Da in vielen Fällen die zu untersuchenden Biotin-Peptide von einer sehr großen Zahl von Begleitpeptiden abgetrennt werden müssen, schien es vorteilhaft, eine selektive Anreicherungsmethode zu entwickeln, die sich spezielle Eigenschaften des Biotins zunutze macht.

Tang und Hartley beschrieben eine Methode, mit der man Methionin-haltige Peptide selektiv aus einem Peptidgemisch abtrennen kann (81): Das Gemisch wird zunächst auf einem schmalen Papierstreifen der Elektrophorese bei pH 6,5 unterworfen. Der getrocknete Streifen wird anschließend mit einer Lösung von Jodacetamid in Pyridin/Acetat-Puffer pH 3,5 besprüht und 14-16 Stunden bei Zimmertemperatur in gesättigter Atmosphäre aufbewahrt. Dabei wird das Methionin in das Sulfoniumsalz umgewandelt.



Die Ausbeute der Umsetzung auf dem Papier beträgt je nach Peptid 40–70%. Der Papierstreifen wird nun getrocknet und gründlich mit Aceton gewaschen, um das Jodacetamid restlos zu entfernen. Dann wird der Streifen in einem großen Papierbogen einge-
näht und eine weitere Elektrophorese bei pH 6.5, nun senkrecht zum Streifen vorge-
nommen. Sämtliche unveränderten Peptide müssen sich dabei in einer Diagonalen an-
ordnen, nur die zum Sulfoniumsalz umgewandelten Methionin-Peptide fallen aus der
Diagonalen heraus.

Um eine zweifache Alkylierung des Cysteins und damit die Bildung eines weiteren
Sulfoniumsalzes zu vermeiden, wird das Protein vor der Spaltung mit Äthylenimin
umgesetzt:



Durch den induktiven Effekt der positiven Ladung am Stickstoff wird die Nucleophilie
des Schwefels herabgesetzt, so daß unter den gegebenen Reaktionsbedingungen keine
merkliche Alkylierung stattfindet. (Die pK_a -Werte für Äthylendiamin liegen um fast
3 Größenordnungen auseinander, $\text{pK}_{a1} = 7.23$ $\text{pK}_{a2} = 10.07$, jeweils für 25.5°C) (82).

Da dieses Reinigungsverfahren für sämtliche Thioäther anwendbar ist, wurde es auf
Biotin-Peptide übertragen. Dabei wurde zunächst eine Reihe von Versuchen mit Biotin
selbst vorgenommen, um die günstigsten Reaktionsbedingungen herauszufinden.

2. Umsetzung von radioaktivem Biotin mit Jodacetamid

Auf Papier wurde unter analogen Bedingungen bei 25 oder 30° nach 2 Tagen 70 bis 80%
Sulfoniumsalz erhalten. Das nicht umgesetzte Biotin läßt sich auch nach abermaligem
Besprühen mit Jodacetamid-Lösung und 2–3tägigem Stehenlassen bei 25 oder 30°C nicht
ins Sulfoniumsalz überführen. Dies ist wahrscheinlich auf eine Oxydation des Biotins
zum Sulfoxid oder Sulfon zurückzuführen. Andererseits ergibt eine Umsetzung von nur
0.67 μMol Biotin mit Jodacetamid etwa die gleiche prozentuale Ausbeute an Sulfonium-

salz wie mit 0.1 oder 0.2 μMol . Daraus ließe sich schließen, daß eine stärkere Oxydation erst unter den Bedingungen der Umsetzung mit Jodacetamid stattfindet (durch die katalytische Wirkung von freiem Jod etwa), denn auch mit Biotin-Peptiden, die bereits einer Elektrophorese unterworfen worden waren und einige Tage an der Luft lagen, ließ sich das Biotin-Sulfoniumsalz mit guter Ausbeute darstellen.

Eine nur teilweise Entalkylierung des Sulfoniumsalzes erfolgt, wenn man den Papierstreifen mit der relativ hohen Konzentration von 0.1 M Kaliumjodid in Pyridin/Acetat-Puffer pH 3.5 besprüht und 3 Tage bei 30° in gesättigter Atmosphäre aufbewahrt. Das Gleichgewicht der Reaktion dürfte also sehr weit auf Seiten des Sulfoniumsalzes liegen.

Mit Ag^+ oder Zn^{++} ließ sich keine höhere Ausbeute an Sulfoniumsalz erzielen (83).

Genaueren Aufschluß über den Verlauf der Reaktion erhält man bei der Umsetzung im Reagenzglas. Es wurden Versuche unter verschiedenen Bedingungen — mit und ohne Thiodiglycol als Schutzreagens, mit und ohne Ag_2SO_4 — durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die Umsetzung auf dem Papier wesentlich schneller verläuft als in Lösung. Während auf dem Papier die maximale Ausbeute spätestens nach 2 Tagen erreicht ist, ist dies in Lösung erst nach etwa 7 Tagen der Fall. Abb. 37 zeigt die Ausbeute an Sulfoniumsalz in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Das Absinken der Ausbeute nach längerer Reaktionszeit dürfte auf den hydrolytischen Zerfall des Sulfoniumsalzes zurückzuführen sein.

3. Umsetzung Biotin-haltiger Peptide mit Jodacetamid

Die Umsetzung wurde analog der des freien Biotins auf Whatman-1-Papier durchgeführt. Die radioaktive Bande aus der Elektrophorese der jeweiligen enzymatischen Spaltung wurde ausgeschnitten, mit 0.2 M Jodacetamid in Pyridin/Acetat-Puffer pH 3.5 (1:10:90) besprüht und 3-4 Tage bei 30° in gesättigter Atmosphäre aufbewahrt. Der Papierstreifen wurde anschließend getrocknet und gründlich mit Aceton gespült. Der so umgesetzte Peptidgipfel wurde auf einen neuen Streifen genäht und abermals der Elektrophorese unterworfen.

Bei den verschiedenen Biotin-Peptiden ergaben sich unter diesen Bedingungen ganz verschiedene Ausbeuten an Sulfoniumsalz. Sie lagen zwischen 0 und 60 bis 70% (Abb. 38-41).

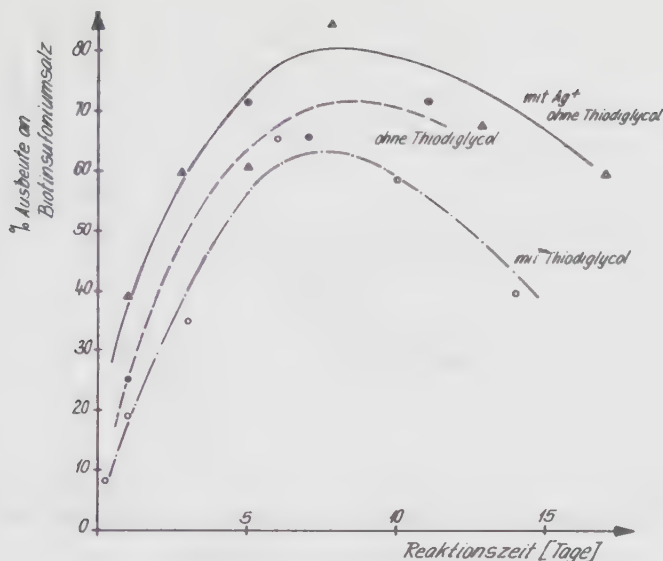


Abb. 37 Umsetzung von radioaktiv markiertem Biotin mit Jodacetamid zum Sulfoniumsalz

Die Synthese wurde in drei parallelen Ansätzen der folgenden Zusammensetzung durchgeführt.

1. 1.8 μMol ^{14}C -Biotin (200 000 Imp/Min)
6 μMol Thiodiglycol
26.6 μMol Jodacetamid
2. 2 μMol ^{14}C -Biotin (150 000 Imp/Min)
26.6 μMol Jodacetamid
3. 2 μMol ^{14}C -Biotin (129 000 Imp/Min)
2.67 μMol Ag^+ als Ag_2SO_4
26.7 μMol Jodacetamid

Die Substanzen waren jeweils in 0.2 ml Pyridin/Acetat-Puffer pH 3.5 (0.67:6.7:90) gelöst. In bestimmten Abständen wurden 0.02 ml-Proben entnommen und der Michl-Elektrophorese auf einem 3 cm breiten Whatman I-Papierstreifen unterworfen. Die Ausbeute wurde durch Ausplanimetrieren der Gipfel des Radiophorogramms des Streifenzählers ermittelt.

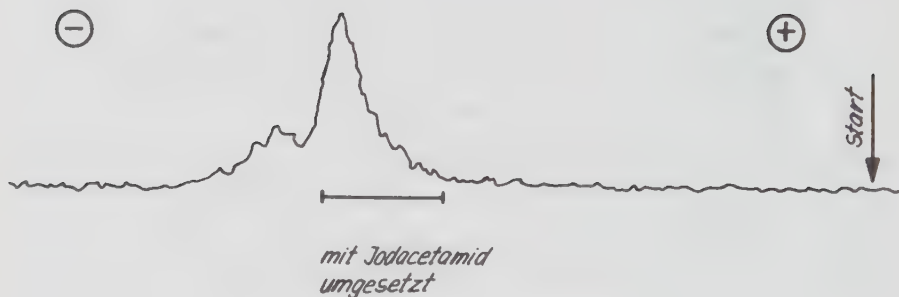


Abb. 38 Michl-Elektrophorese eines ^{14}C -Biotin-Peptids einer 14tägigen Spaltung von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase mit Pepsin

Die Peptide einer Spaltung mit 10% Pepsin (bezogen auf das eingesetzte Protein), die bei 37°C zunächst einen Tag bei pH 2.0, dann 13 Tage bei pH 0.75 durchgeführt wurde (84), wurden über eine Dowex 1x2-Säule chromatographiert.

20 000 Imp/Min. des Hauptgipfels wurden mit Äthylenimin umgesetzt (39, 40) und dann der Michl-Elektrophorese bei pH 6.5 auf Whatman 1-Papier unterworfen.

43 V/cm, Laufzeit 4 Std., Pyridin/Acetatpuffer (10:0.4:90).

Die Verteilung der Radioaktivität wurde mit dem Streifenzähler ermittelt.

Spaltbreite der Blende: 0,5 cm.



Abb. 39 Michl-Elektrophorese eines mit Jodacetamid umgesetzten ^{14}C -Biotin-Peptids aus einer 14tägigen Spaltung von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase mit Pepsin

Die radioaktive Bande der Michl-Elektrophorese einer 14tägigen Spaltung mit Pepsin (Abb. 38) wurde ausgeschnitten und 64 Stdn. bei 30°C mit 0.2 M Jodacetamid bei pH 3.5 auf dem Papier umgesetzt. Das überschüssige Jodacetamid wurde anschließend mit Aceton entfernt. Das Papierstück wurde in einen Whatman I-Papierstreifen eingenäht und einer neuerlichen Michl-Elektrophorese bei pH 6.5 unterworfen. (Pyridin-Acetat-Puffer 10:0.4:90), Laufzeit 3 Stdn. 43 V/cm. Die Radioaktivitätsverteilung wurde mit dem Streifenzähler ermittelt. Spaltbreite der Blende 1 cm.

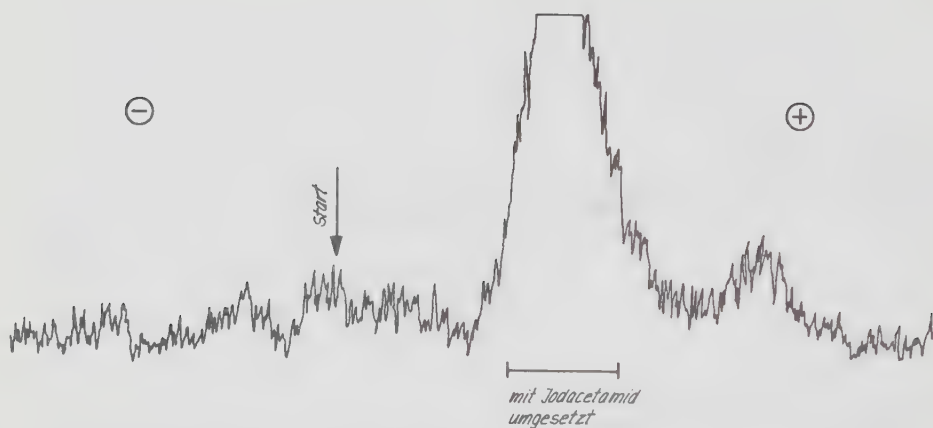


Abb. 40 Michl-Elektrophorese der Peptide einer halbstündigen Spaltung von ^{14}C -Biotin-markierter β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase mit Pepsin

0.55 mg (20 000 Imp/Min) β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase wurden bei 70°C mit Mercaptoäthanol und anschließend Äthylenimin umgesetzt (39, 40). Der Protein-niederschlag wurde in 10proz. (V/V) Ameisensäure mit 3% (bezogen auf die ein-gesetzte Proteinmenge) Pepsin 30 Min. bei Raumtemperatur gespalten.

3stündige Elektrophorese bei 43 V/cm, Whatman I-Papier, Pyridin-Acetat-Puffer pH 6.5 (10:0.4:90).

Die Radioaktivitätsverteilung wurde mit dem Streifenzähler ermittelt. Spaltbreite der Blende: 1 cm (Einzelheiten s. Exp. Teil).

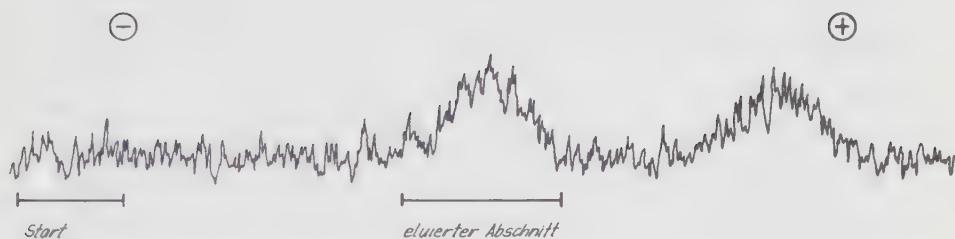


Abb. 41 Michl-Elektrophorese des mit Jodacetamid umgesetzten ^{14}C -Biotin-Peptids der halbstündigen Spaltung von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase mit Pepsin

Die radioaktive Bande der Michl-Elektrophorese der halbstündigen Spaltung mit Pepsin (Abb. 40) wurde ausgeschnitten und 2 Tage bei 30°C mit 0.2 M Jodacetamid bei pH 3.5 auf dem Papier umgesetzt. Das überschüssige Jodacetamid wurde anschließend mit Aceton entfernt. Das Papierstück wurde in einen Whatman I-Papierstreifen eingenäht und einer neuerlichen Michl-Elektrophorese bei pH 6.5 unterworfen.

(Pyridin/Acetat-Puffer 10:0.4:90), Laufzeit 5 Stdn., 43 V/cm.

Die Radioaktivitätsverteilung wurde mit dem Streifenzähler ermittelt.

Spaltbreite der Blende 1 cm.

4. Reinigung eines Peptids durch Nachspaltung

Ein starker Reinigungseffekt ist zu erwarten, wenn man durch entsprechende Spaltungsbedingungen zunächst ein größeres Peptid herstellt. Dieses Peptid kann man nun nach einem oder mehreren Reinigungsschritten in ein kleineres weiterspalten. Die Zahl der von diesem neuen Peptid abzutrennenden Begleitpeptide ist nun von vornherein wesentlich kleiner, als wenn die Spaltung gleich bis zu dieser Größe durchgeführt worden wäre. Außerdem lassen sich die zunächst benützten Trennungsmethoden wieder anwenden.

Aus dem Biotin-Peptid der halbstündigen Spaltung von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase mit Pepsin und dessen Sulfoniumsalz entsteht nach der Spaltung mit Trypsin ein Peptid ganz anderer elektrophoretischer Eigenschaft: Während das peptische Peptid und dessen Sulfoniumsalz bei pH 6.5 zur Anode wandern, wandert das aus ihnen hervorgegangene tryptische Peptid zur Kathode (Abb. 41, 42).

Kurze Spaltungen mit Pepsin haben den Vorteil, daß sie relativ spezifisch sind und Transpeptidierungen kaum vorkommen. Es entsteht dabei ein größeres Peptid (85).

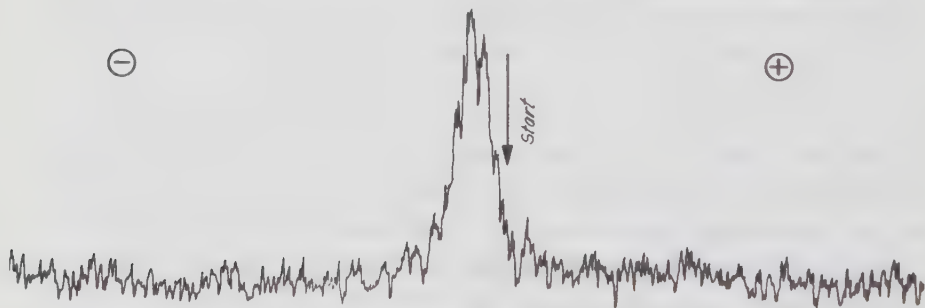


Abb. 42 Michl-Elektrophorese des mit Trypsin gespaltenen ^{14}C -Biotin-Sulfoniumsalz-Peptids der halbstündigen Spaltung von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase mit Pepsin

Die Sulfoniumsalz-Bande des Biotinpeptids der halbstündigen Spaltung mit Pepsin (Abb. 41) wurde vom Papier eluiert und bei pH 8.0 bei Raumtemperatur über Nacht mit 16 μg Chymotrypsin-freiem Trypsin gespalten. Die Michl-Elektrophorese wurde bei pH 6.5 mit Pyridin-Acetat-Puffer (10:0.4:90) auf Whatman I-Papier durchgeführt. 43 V/cm, Laufzeit 1 $\frac{1}{2}$ Stdn.

Die Radioaktivitätsverteilung wurde mit dem Streifenzähler ermittelt. Spaltbreite der Blende 1 cm.

Zusammenfassung und Diskussion

Die Methode von Tang und Hartley (81) zur selektiven Anreicherung von Methionin-Peptiden über die Bildung des Sulfoniumsalzes konnte auf Biotin-Peptide übertragen werden. Es wurden Ausbeuten von 60-70% Sulfoniumsalz erreicht. Diese Umsetzungen wurden mit verschiedenen Biotin-Peptiden aus β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase durchgeführt; darunter fand sich allerdings auch eines, das sich überhaupt nicht zum Sulfoniumsalz umsetzen ließ.

Zur Anwendung auf größere Mengen sollte es möglich sein, diese Methode auf Ionenaustauscher-Säulen zu übertragen. Dabei sollten die Bedingungen wenn möglich so gewählt werden, daß das Biotin-Sulfoniumsalz-Peptid zuerst eluiert wird. Im umgekehrten Fall würde es möglicherweise durch adsorbierte Peptide verunreinigt. Bei der Papier-Elektrophorese wurde nämlich eine schwache Adsorption der Biotinpeptide beobachtet.

Zur Bestimmung der Sequenz eines Proteins muß man es zunächst bis zur gewünschten Größe der Peptide hydrolytisch spalten und diese anschließend voneinander trennen. Da wir aber nur ein einziges Peptid isolieren wollten, spalteten wir die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase zunächst nur bis zu einem relativ großen Peptid.

Durch einen oder zwei Reinigungsschritte läßt sich davon die Hauptmenge der begleitenden Peptide abtrennen. Bei der anschließenden Spaltung des teilweise gereinigten großen Peptids bis zur gewünschten Größe entstehen wieder Begleitpeptide, die sich relativ stark voneinander unterscheiden. Die zunächst benützten Trennungsmethoden lassen sich dann wieder anwenden.

VII. Experimenteller Teil

1. Verwendete Geräte

- Präparative Ultrazentrifugen Beckman Spinco Modell L 40, L 50, L 2-65B,
L 3-40, L 3-50
- Präparative Zentrifugen Servall RC-2 und RC-2B
- Präparative Zentrifuge W. Stock Maschinenbau K.G. Marburg/Lahn
- Durchlaufzentrifuge Sharples T 313 A 49 A mit Rotor 24 B
- Tischzentrifuge Christ Superspeed Junior 1
- Photometer Eppendorf, Netheler und Hinz, Hamburg mit Philips-Kompensograph
- Spektralphotometer Zeiss, Modell M 4 Q II
- Photomikroskop Zeiss
- Flüssigkeits-Scintillationsspektrometer Packard Tri-Carb
Modell 314 und 544
- Radiopapierchromatograph Friesseke und Hoepfner Modell FH 452
mit Linienschreiber
- Gleichspannungs-Speisegerät Camag
- Gleichspannungs-Speisegerät Buchler
- Isoelektrische Fokussierungs-Apparatur für 110 ml
LKB-Produkte AB
- Hochspannungsgleichrichter Fa. Hölzel, Dorfen
- Michl-Elektrophorese-Apparatur, Savant Instruments Inc.
Modell LT-48 A
- Michl-Elektrophorese-Apparatur, Eigenbau, Moosbauer
- Kleines und großes Zellaufschlußgerät nach Merckenschlager, Schlossmann und Kurz,
Eigenbau, Moosbauer
- Membranfiltrationsgeräte und -Filter Amicon N.V.
- Bakterienfilter und Kollodiumhülsen, Sartorius Membranfilter
- pH-Meter, Knick, Berlin Typ 27
- pH-Meter, Püsl, München Typ 11/12
- Heißdampfsterilisator Küster, Berlin

2. Herkunft der verwendeten käuflichen Enzyme, Substrate und Chemikalien

Lactatdehydrogenase, Pyruvatkinase, Cytochrom c , ATP,
Phosphoenolpyruvat, NADH, CoA von Boehringer, Mannheim
Serumalbumin vom Rind von den Behringwerken, Marburg
Avidin, Trypsin, Pepsin, 1-(1-Tosylamido-2phenyl) äthylchloromethyl-keton,
Acrylamid, N.N'-Methylenbisacrylamid, Dowex 50x2, 50x8, 1x2, 2x8, Phospho-
zellulose, Natriumdodecylsulfat, Trimethylcetylammmonium-Bromid, Dithiothreitol,
Coomassie Brillanthlau G von Serva, Heidelberg
DEAE-Zellulose von Macherey, Nagel und Co., Düren
Sephadex G 25, G 75, G 200 von Pharmacia, Uppsala
Bacto-Agar, Bacto-Pepton von Difco, Detroit
Ampholine pH 3-5 von LKB-Produkte AB, Bromma (Schweden)
Äthylenimin, Jodacetamid, Dimethylacrylsäure, Isovaleriansäure, Kaliumcyanat,
Guanidinhydrochlorid, N.N.N'.N'-Tetramethyläthylendiamin, Kaliumborhydrid,
von Schuchardt, München Diäthylpyrocarbonat von Roth, Karlsruhe
Aluminiumoxyd von Alcoa, Arkansas
Varsol von Esso, München
2,5-Diphenyloxazol, 1,4-Bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazol)-benzol
von Packard Instruments Frankfurt/Main

Alle nicht eigens angeführten Chemikalien stammten von der Firma Merck, Darmstadt.
Außer für die Züchtungsmedien wurde die höchste Reinheitsstufe verwendet.

Biotin und ^{14}C -Biotin waren Geschenke der Firma Hoffmann-La Roche, Basel.

3. Züchtung der Bakterien

Die Versuche wurden mit *Acromobacter* IVS durchgeführt, einem Stamm, der auf Isovaleriansäure als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann.

Zur Aufbewahrung wurde ein Teil in gefriergetrockneter Form bei -16° gehalten. Ein anderer Teil wurde etwa alle 3 Monate auf Fleischextrakt-Agar (20) übertragen und bei 30° gehalten, bis sich eine Bakterenschicht gebildet hatte. Diese Bakterien wurden dann bei 4° aufbewahrt (21).

Der Fleischextraktagar hat die folgende Zusammensetzung (20):

In einem Liter befinden sich

10 gr Fleischextrakt (Merck)
10 gr Pepton (Difco)
9 gr NaCl
6 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

Die Lösung wird mit KOH auf pH 7.4 eingestellt, dann werden

20 gr Agar (Difco) zugegeben.

Das Isovaleriansäure-Minimalmedium (11) wird in konzentrierter Form bei Raumtemperatur aufbewahrt und für die Züchtung jeweils verdünnt.

In 10 Ltr. werden gelöst:

1 000 gr NaCl
1 200 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
360 gr KH_2PO_4
20 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
2 gr $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
1 gr $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
1.5 gr EDTA (freie Säure)
0.2 gr $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

dazu werden 10 gr $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, gelöst in wenig H_2O , gegeben.

Die konzentrierte Salzlösung wird mit 1 Ltr. Isovaleriansäure versetzt und unter Rühren mit konzentrierter Kalilauge auf pH 7.4 gebracht. Es fällt dabei ein Niederschlag aus. Zur Züchtung wird das aufgewirbelte Medium so weit verdünnt, daß 1 Ltr. 5 ml Isovaleriansäure enthält. Für den Isovaleriansäure-Agar wird das Medium auf 2.5 ml Isovaleriansäure pro Liter verdünnt. Dazu werden 2% Agar gegeben.

Das Acetat-Medium wurde analog hergestellt. Statt Isovaleriansäure wurde das gleiche Volumen Eisessig eingesetzt.

Die Bakterien ließen sich nicht auf Isovaleriansäure-Minimalmedium-Agar plattieren. Sie wuchsen darauf erst, wenn sie in höherer Dichte vom Fleischextrakt-Agar übertragen wurden. Am besten verwendet man dazu frisch gewachsene Bakterien.

Zur weiteren Züchtung wurde die Bakterienschicht von 2 Isovaleriansäure-Schrägararröhrchen, die sich nach etwa 3-4 Tagen gebildet hatte, in 100 ml Isovaleriansäuremedium übertragen. Nachdem die Öffnungen jeweils abgeflammt worden waren, wurden die Röhrchen so weit mit Medium gefüllt, daß sich die gesamte Agarfläche im Medium befand. Mit einer abgeflamten Nadel wurde dann die Bakterienschicht abgelöst und die Suspension zurückgegossen. Die Züchtung der 100 ml-Kultur erfolgte in einem Erlenmeyerkolben von 250 oder 300 ml, der mit einem Wattepfropfen verschlossen war und bei 30° mit 100 Umdrehungen pro Minute geschüttelt wurde.

Nach 1 bis 2 Tagen erreichte die Kultur im allgemeinen eine Bakteriendichte (Extinktion = 1), daß sie in ein 1-Ltr.-Medium übertragen werden konnte. (Die Bestimmung der Bakteriendichte wird am Ende des Kapitels beschrieben.) Die Kultur wurde unter den gleichen Bedingungen in einem 2-Ltr.-Erlenmeyerkolben geschüttelt.

Nach weiteren 1 bis 2 Tagen waren die Bakterien wiederum so weit gewachsen, daß sie auf eine 6-Ltr.-Belüftungskultur übertragen werden konnten. Das Medium befand sich in einer 10-Ltr.-Glasflasche. Die durch ein mit Watte gefülltes CaCl_2 -Rohr gefilterte Luft wurde durch ein sterilisiertes Glasrohr eingeleitet. Die Belüftung wurde stufenweise mit dem Bakterienwachstum erhöht (Abb. 43). Nach etwa einem Tag wurde die Kultur auf fünf 20-Ltr.-Medien in 25-Ltr.-Polyäthylenflaschen verteilt. Bis zu dieser Stufe waren die Bakterien unter sterilen Bedingungen gezüchtet worden. Bei dieser, der letzten Stufe, wurde darauf verzichtet. Die Bakterien wurden wiederum bei stufenweise gesteigerter Belüftung gezüchtet (Abb. 4). Die durch eine Watteschicht von etwa 10 cm filtrierte Luft wurde durch ein Glasrohr eingeleitet, an dessen Ende ein

Bimsstein von 2.5 x 2.5 x 5 cm angebracht war. Nach 20 bis 30 Stunden hatte die Extinktion einen Wert von 1.5 bis 2.2 erreicht und die Kulturen wurden in der Sharples-Durchlaufzentrifuge bei 45 000 Umdrehungen pro Minute mit einer Pumpgeschwindigkeit von etwa 25 Ltr. pro Stunde abzentrifugiert. Es wurden etwa 350 bis 500 gr einer rotbraunen Bakterienmasse erhalten.

Das durchgelaufene Medium, das immer noch Bakterien in geringer Konzentration enthielt, wurde neuerlich in gleicher Weise belüftet. Nach 20 bis 30 Stunden konnte man wieder etwa die gleiche Bakterienmenge abzentrifugieren.

Zur radioaktiven Markierung der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase wurden jeder der 5 Flaschen 10^7 Imp/min ($0.33 \mu\text{M}$) ^{14}C -Biotin zugesetzt. Da, wie aus Abb. 5 zu ersehen ist, das Biotin erst etwa 12 Stunden nach der Zugabe aufgenommen wird, wurden des öfteren bereits der 6-Ltr.-Kultur $0.11 \mu\text{M}$ an kaltem Biotin zugesetzt.

Die Bakteriendichte wurde durch Trübungsmessung bei $578 \text{ m}\mu$ mit dem Photometer Eppendorf (Serie 11, Blende 7 x 12 mm, $d = 1 \text{ cm}$) gemessen. Bis zur Extinktion 0.9 ist die Bakteriendichte der Trübung proportional (Abb. 44). Liegt die Extinktion über 0.9, so muß die Bakteriensuspension entsprechend verdünnt werden.

Um die Kulturen reproduzierbar zu belüften, wurde der Staudruck gemessen, den die ausströmende Luft beim Durchströmen eines Glasrohrs von 30 cm Länge und 3 mm Durchmesser erzeugt. Eine bestimmte pro Zeiteinheit durchgeströmte Luftmenge entspricht damit einem bestimmten Staudruck in cm Wassersäule (Abb. 45) (86).

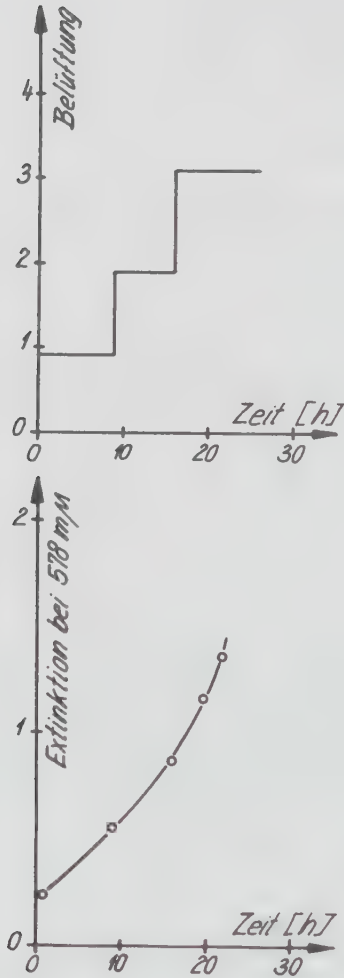


Abb. 43 Wachstum von *Achromobacter* IVS in einer 6-Ltr.-Belüftungskultur bei stufenweise gesteigerter Luftzufuhr

Die Zusammensetzung des Isovaleriansäure-Minimalmediums wurde auf Seite 73, die Messung der Belüftung auf Seite 75 beschrieben.

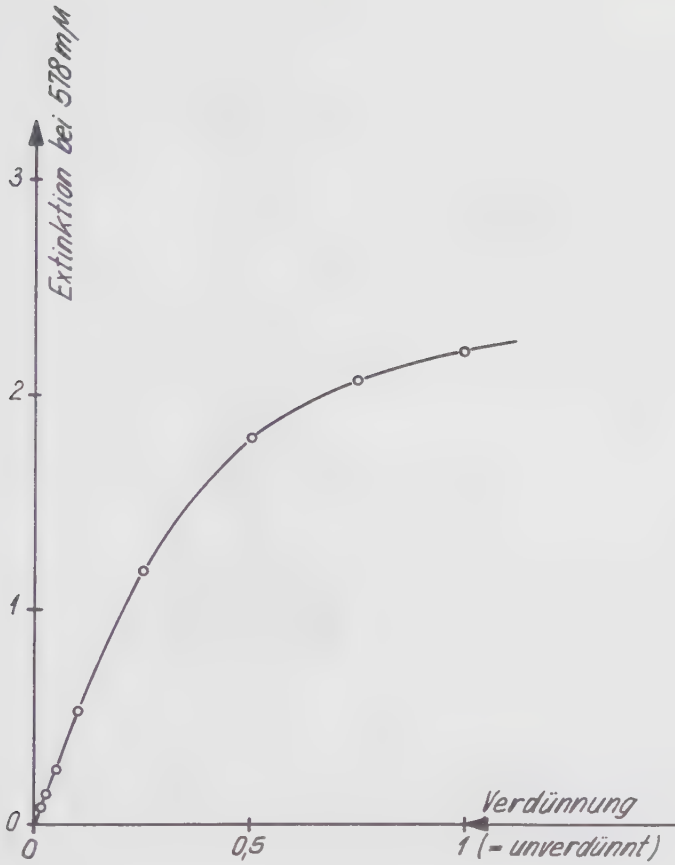


Abb. 44 zeigt die Abhängigkeit der Trübung in Extinktionseinheiten von der Bakteriendichte. Zur Bestimmung der Kurve wurde eine konzentrierte Bakteriensuspension stufenweise verdünnt und jeweils die Extinktion gemessen

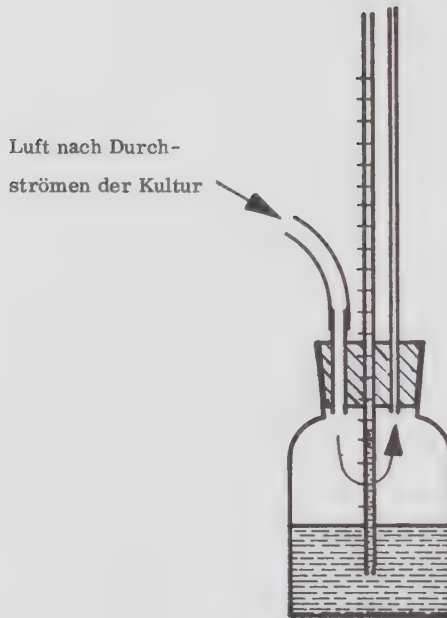


Abb. 45 zeigt die Anordnung mit der ein Maß für die Luftmenge erhalten wurde, die pro Zeiteinheit die Kultur durchströmte.

Das Steigrohr wurde unten verengt, um eine stärkere Dämpfung zu erzielen.

4. Die Anreicherung der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase

Die Enzymanreicherung wurde nach dem Verfahren von Apitz, Rehn und Lynen durchgeführt (36), die auf die Methode von Himes, Joung, Ringelmann und Lynen (13) zurückgeht. Spätere Anreicherungen wurden dann noch etwas modifiziert.

Um den größten Teil des gleichzeitig anzureichernden "freien" Biotin-Carboxylcarrier-Proteins im Überstand der Geladsorption zu halten, wurde die Konzentration an Phosphatpuffer im Rohextrakt erhöht.

Eine zusätzliche Anreicherung ließ sich durch Einfrieren der Proteinlösung nach der 2. Ammoniumsulfat-Fällung auf -30° erreichen. Beim Auftauen fiel Protein aus, das Enzym jedoch blieb in Lösung.

Die Anreicherung wurde wie folgt durchgeführt:

a) Rohextrakt

200 gr der eingefrorenen Bakterienmasse wurden in Stücke geschnitten und mit soviel 0,01 M Na_2HPO_4 -Lösung versetzt, daß sich ein Volumen von 750 ml ergab. Dazu wurde noch 1 ml n-Octanol gegeben.

Die Bakteriensuspension wurde jeweils in Teilen von 150 ml mit 300 gr Glasperlen (31/10) 3 Minuten im Homogenisator nach Merkenschlager, Schlossmann und Kurz (22) aufgeschlossen. Die Glasperlen wurden auf einer G O-Glasfritte abfiltriert und für den nächsten Teilaufschluß verwendet. Um den im Homogenisator entstandenen Schaum zu sammeln zu lassen, wurde der Aufschluß anschließend 20 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Die Partikel wurden 110 Minuten bei 40000 g abzentrifugiert. Im allgemeinen wurde der Überstand bei 4° aufbewahrt und am folgenden Tag der Gelschritt durchgeführt. Der Rohextrakt kann auch eingefroren aufbewahrt werden.

b) Geladsorption

Mit Phosphatpuffer pH 6.0 wurde der Rohextrakt auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml (nach der Biuret-Methode) und 0,0135 M an Phosphat gebracht. Dazu wurde so viel eines 40 mg/ml enthaltenen Ca-Phosphatgels gegeben, daß auf 1 g Protein 4 g Gel kamen. Der pH-Wert wurde mit 2 M Essigsäure auf 6.0 eingestellt und die Suspension anschließend noch 10 Minuten gerührt. Das Gel wurde 10 Minuten bei 2000 g

abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde "freies" Biotin-Carboxylcarrier-Protein isoliert. Das Gel wurde zweimal mit dem doppelten Volumen der eingesetzten Gelsuspension an 0.01 M K-Phosphatpuffer pH 6.0 gewaschen. Dabei wurde das Gel jeweils mit einem Plümper fein verteilt. Anschließend wurde das Enzym mit dem gleichen Volumen der eingesetzten Gelsuspension an 0.04 M Kalium-Phosphatpuffer pH 6.4 eluiert, wobei zunächst mit 2/3, dann mit 1/3 des Volumens eluiert wurde.

c) 1. Ammoniumsulfat-Fällung

In den vereinigten Geleluaten wurde festes Ammoniumsulfat bis zu 60proz. Sättigung gelöst, wobei der pH-Wert durch Zutropfen von 2 M NH_3 -Lösung bei 7.0 gehalten wurde. Es wurde 45 Minuten bei 4° gerührt, dann wurde der Niederschlag 40 Minuten bei 10 000 g abzentrifugiert.

d) 2. Ammoniumsulfat-Fällung

Der Niederschlag der 1. Ammoniumsulfat-Fällung wurde in wenig 0.03 M K-Phosphatpuffer pH 7.2 aufgelöst und auf einer Proteinkonzentration von 8.5 mg/ml gebracht. Wie oben, wurde Ammoniumsulfat bis zu 30proz. Sättigung gelöst. Es wurde 30 Minuten bei 4° gerührt und der Niederschlag wiederum 40 Minuten bei 10 000 g abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde das Enzym durch weitere Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu 50% Sättigung unter gleichen Bedingungen ausgefällt. Nach abermaligem 30minütigem Rühren wurde der Niederschlag 40 Minuten bei 10 000 g abzentrifugiert.

e) Einfrieren und Auftauen

Der in wenig 0.03 M K-Phosphatpuffer pH 7.2 gelöste Niederschlag der 2. Ammoniumsulfat-Fällung wurde auf -30° eingefroren. Beim Auftauen fiel Protein aus, das 20 Minuten bei 10 000 g abzentrifugiert wurde. Das Enzym blieb im Überstand; es hatte praktisch keine Aktivität verloren.

f) Chromatographie an Sephadex G 200

Die Enzymlösung wurde auf eine Sephadex G 200-Säule (4.2 x 120 cm, 40 - 120 μ Perldurchmesser) aufgesetzt, die mit 0.03 M K-Phosphatpuffer pH 7.2 und 0.02% NaN_3 äquilibriert war. Pro Quadratzentimeter Säulenoberfläche wurden bis zu 70 mg Protein aufgesetzt. Es wurde ein Druck von 7-12 cm Wassersäule angewendet. Der Gipfel der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase erschien kurz nach der Ausschlußgrenze.

g) Chromatographie an DEAE-Zellulose

Die Fraktionen des β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase-Gipfels wurden direkt auf eine DEAE-Zellulose-Säule aufgesetzt, die mit 0.1 M NaCl in 0.03 M K-Phosphatpuffer pH 7.2 aequilibriert war. Das Volumen der Säule richtete sich nach der aufgesetzten Proteinmenge. Es wurde mindestens 1 ml DEAE-Zellulose pro 2 mg Protein verwendet. Die Säulenlänge war mindestens fünfmal größer als der Durchmesser. Mit einem linearen Gradienten von 0.1 bis 0.5 M NaCl in 0.03 M K-Phosphatpuffer pH 7.2 wurde das Protein eluiert. β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase erscheint zwischen 0.2 und 0.3 M NaCl.

In den vereinigten Fraktionen des β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase-Gipfels wurde festes Ammoniumsulfat bis zu 70proz. Sättigung gelöst. Die Lösung wurde über Nacht bei 4⁰ stehen gelassen und dann 40 Minuten bei 10 000 g abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in wenig 0.03 M K-Phosphatpuffer pH 7.2 aufgelöst und bei -30⁰ eingefroren aufbewahrt. Es wurden nur geringe Aktivitätsverluste beobachtet.

5. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, nach Warburg und Christian (87) durchgeführt.

6. Die Bestimmung der Enzymaktivität

Die Aktivitätsbestimmung nach Himes et al. (13) wurde von Apitz et al. (36) geringfügig verändert. Ein Testansatz enthielt in der Stammlösung

0.2 ml	1 M Tris HCl pH 8.0
0.008 ml	1 M MgCl ₂
0.01 ml	0.1 M ATP
0.015 ml	0.1 M Phosphoenolpyruvat
0.01 ml	1 M KHCO ₃

Zur Stammlösung wurde so viel H₂O gegeben, daß das Endvolumen 2.0 ml betrug.

Dann wurden

0.03 ml	0.01 M NADH
0.10 ml	10 mg/ml Serumalbumin
0.01 ml	5 mg/ml Lactatdehydrogenase
0.01 ml	2 mg/ml Pyruvatkinase

und das Enzym in passender Menge zugegeben. Mit der Zugabe von 0.2 μ Mol β -Methylcrotonyl-CoA wurde die Reaktion in Gang gebracht.

Der Test wurde in einer 1x1-cm-Glasküvette durchgeführt und die Extinktionsabnahme bei 334 m μ im Photometer Eppendorf verfolgt. Als eine Aktivitätseinheit (AE) wurde die Enzymmenge definiert, die pro Minute ein μ Mol β -Methylcrotonyl CoA carboxyliert.

7. Radioaktivitätsbestimmung mit dem Scintillationszähler

Die zu bestimmenden Proben wurden auf einen Whatman-1-Papierstreifen von 3 x 7 cm aufgetragen und mit dem Fön getrocknet. Die Papierstreifen wurden in Zählgläschen gesteckt, die mit einer Toluollösung von 5 gr 2,5-Diphenyloxazol und 0.5 gr 1,4-Bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazol)benzol in Liter gefüllt waren und im Scintillationszähler ausgemessen.

8. Darstellung von β -Methylcrotonyl-CoA

β -Methylcrotonyl-CoA wurde nach der Vorschrift von Knappe, Schlegel und Lynen (10) hergestellt.

Die Reaktion wurde unter Stickstoff durchgeführt und mit dem pH-Meter kontrolliert. 50 mg CoA in 20 ml H₂O wurden mit KOH auf pH 8-9 gebracht; dann wurden 35 mg KBH₄ zugesetzt. Die Lösung wurde 15 Minuten bei 30° stehen gelassen. Mit HCl wurde anschließend bis auf pH 3 angesäuert. Die Lösung wurde dann auf 50 ml verdünnt und mit KHCO₃ gepuffert. Unter Rühren wurden 0.15 ml β -Methylcrotonsäureanhydrid zugegeben.

Während der Umsetzung wurde der pH-Wert bei 7.5 gehalten. Nach etwa 30 Minuten war der Nitroprussid-Test negativ. Mit Dowex 50 in der H⁺-Form wurde die Lösung dann angesäuert und dreimal mit Peroxyd-freiem Äther ausgeschüttelt. Um die wäßrige Phase vom gelösten Äther zu befreien, wurde Stickstoff durchgeblasen. Schließlich wurde der pH-Wert mit KOH auf 4.5-5 eingestellt und die Lösung durch Gefrier-trocknen konzentriert.

Das β -Methylcrotonsäureanhydrid wurde über das Säurechlorid hergestellt.

Tabelle 3 Beispiel einer mittleren Anreicherung von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase

	Vol. (ml)	Protein- konz. (mg/ml)	Protein- menge (mg)	Radioakt. (Imp/min)	Enzymakt. (AE)	Spez. Enzymakt. (AE/mg Prot)	Radioakt. %	Ausbeute Enzymakt. %
Rohextrakt	750	19.8	14 860	$1.885 \cdot 10^6$	863	0.058	100	100
Geladsorption	1012	1.22	1 240	$0.864 \cdot 10^6$	475	0.42	46	55
1. Ammonium- sulfat-Fällg.	107	8.9	946	$0.851 \cdot 10^6$	435	0.46	45	50
2. Ammonium- sulfat-Fällg.	12	41.5	515	$0.688 \cdot 10^6$	421	0.83	37	49
Chromatogr. an Sephadex G 200	200	0.53	105	$0.603 \cdot 10^6$	313	2.98	32	36
Chromatogr. an DEAE-Zellulose	58	0.47	27	$0.384 \cdot 10^6$	255	9.36	20	30

Die Ausbeuten lagen zwischen 15 und 45 mg. Es wurden spezifische Aktivitäten bis 11.5 erhalten.

9. Darstellung von Acetyl-CoA

Acetyl-CoA wurde durch Umsetzung von Acetanhydrid mit CoA hergestellt (88). Es wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt.

10. Die Herstellung des Calciumphosphat-Gels (89)

353.2 gr $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ wurden in 68 Ltr. H_2O gelöst. Dazu wurden 604.8 gr $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ in 4 Ltr. unter Rühren langsam zufließen gelassen. Der Niederschlag wurde absitzen gelassen, der Überstand abdekantiert und der Niederschlag wieder aufgeschlämmt. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis mit AgNO_3 -Lösung kein Cl^- mehr nachgewiesen werden konnte. Dann wurde der Niederschlag bei 2 000 g abzentrifugiert und schließlich mit H_2O auf 7 Ltr. aufgefüllt und durch kräftiges Rühren wieder fein verteilt.

11. Acetonfällung des Überstands der Geladsorption (zu IV)

Der Überstand der Geladsorption wird mit dem Rotationsverdampfer auf etwa $\frac{1}{2}$ Ltr. eingengt, wenn man bei der Anreicherung von 200 gr Bakterien ausging. Dann wird das 1,75fache Volumen an Aceton in die Lösung eingerührt. Der Niederschlag wird 40 Minuten bei 10 000 g in Stahlbechern abzentrifugiert. Der Überstand wird anschließend mit dem Rotationsverdampfer wieder auf etwa $\frac{1}{2}$ Ltr. eingengt. Dabei fällt wiederum ein Niederschlag aus, der ebenfalls 40 Minuten bei 10 000 g abzentrifugiert wird. Der Überstand wird dann durch Gefriertrocknung weiter eingengt. Dies ist notwendig, da bei weiterem Einengen mit dem Rotationsverdampfer zuviel Biotin-Carboxylcarrier-Protein ausfällt.

12. Isoelektrische Fokussierung des Biotin-Carboxylcarrier-Proteins (zu IV)

Die isoelektrische Fokussierung des "freien" Biotin-Carboxylcarrier-Proteins wurde in einer 110-ml-LKB-Apparatur nach der beiliegenden Vorschrift durchgeführt. Ampholinlösung pH 3-5 wurde zunächst durch ein Membranfilter von 0.15μ Porenweite gedrückt und dann auf 1% verdünnt. Die Kathode wurde unten, die Anode oben angelegt. Als Kathodenflüssigkeit wurde Natronlauge, als Anodenflüssigkeit Schwefelsäure verwendet. Die Proteinlösung wurde mit etwa dem $1\frac{1}{2}$ fachen Volumen "leichter" und "schwerer" Ampholinlösung versetzt und auf den Gradienten aufgesetzt, nachdem die Säule etwa zur Hälfte gefüllt war. Die Säule wurde mit Wasser von 5° gekühlt. Bei

abnehmender Stromstärke wurde die Spannung in dem Maße erhöht, daß 3 Watt nicht überschritten wurden. Blieb die Stromstärke dann konstant, wurde nach einem weiteren Tag die isoelektrische Fokussierung beendet.

Das Biotin-Carboxylcarrier-Protein wurde über eine kurze Sephadex G 25-Säule, die mit Pyridin/Acetat-Puffer pH 6.5 (10:0.4:90) aqulibriert war, von der Ampholine-lösung abgetrennt.

13. Gradientenlauf mit dem SW-40-Rotor (zu IV + V)

Zur Kontrolle wurden die Spaltansätze von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase in einem Saccharose-Gradienten sedimentiert. In die Zellulosenitratbecher wurden zunächst 1.5 ml einer 50proz. (Gew/Gew) Saccharoselösung gefüllt. Darauf wurde ein linearer Gradient von 5-20% (Gew/Gew) Saccharose (26) in der jeweiligen Puffer- oder Salzlösung geschichtet. Die beiden Mischungsbehälter enthielten je 5.7 ml. Die Gradienten wurden im Kühlraum abgekühlt. Es wurden maximal 1.5 mg Protein in bis zu 0.4 ml aufgesetzt. Der Rotor wurde mit 39 000 U/Minute etwa 20 Stunden bei 5° laufen gelassen. Nach beendetem Lauf wurden die Becher unten angestochen und die unter Druck herauströpfende Flüssigkeit nach Tropfenzahl oder nach Gewicht fraktioniert.

Das "Polster" der 1.5 ml 50proz. Saccharoselösung bewirkt, daß ungespaltene β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase nicht bis zum Boden des Röhrchens sedimentiert. Ein solcher Niederschlag würde sich bei der anschließenden Fraktionierung langsam wieder auflösen und über die verschiedenen Fraktionen verteilen.

14. Abschätzung der Svedbergkonstanten (zu IV + V)

Die Svedbergkonstante S ist definiert als

$$S \equiv 10^{13} \frac{dr/dt}{r \omega^2}$$

r (cm) Abstand von der Rotationsachse

t (sek)

Das Gravitationsfeld $r \omega^2$ nimmt linear mit dem Abstand zur Rotationsachse zu. Einer entsprechenden Erhöhung der Sedimentationsgeschwindigkeit wirken jedoch die ansteigende Viscosität und das ansteigende spezifische Gewicht des Saccharose-Gradienten

entgegen. Unter den angewendeten Bedingungen (26) heben sich diese Effekte für ein Protein vom spezifischen Gewicht 1.36 gerade auf. Es sedimentiert also mit konstanter Geschwindigkeit. Da jedoch der Einfluß der Viscosität wesentlich größer ist, als der des spezifischen Gewichts (5% Saccharose-Lösung 0°C, $\rho = 1.020$, 20proz. Saccharose-Lösung 0°C, $\rho = 1.085$) kann man auch für Proteine deren spezifisches Gewicht relativ weit von 1.36 entfernt ist, eine annähernd konstante Sedimentationsgeschwindigkeit annehmen.

Die im Gradienten zurückgelegte Strecke des Proteins ist dann seiner Sedimentationskonstanten proportional. Durch Multiplikation mit dem Faktor

$$\frac{\eta \text{ (5 \% Saccharose-Lösung, } 5^{\circ}\text{C)}}{\eta \text{ (H}_2\text{O, } 20^{\circ}\text{C)}}$$

läßt sich die experimentell ermittelte Sedimentationskonstante auf Normalbedingungen (H_2O , 20°C) umrechnen. Mit der folgenden Formel läßt sich die korrigierte Svedberg-Konstante unter den angewendeten Bedingungen abschätzen:

$$S_{(\text{H}_2\text{O, } 20^{\circ}\text{C})} = 398 \frac{\text{Volumen von der Oberfläche bis z. Gipfel}}{\text{Gesamtvolumen des Bechers}} \cdot t \text{ (h)}$$

15. Spaltungsversuche durch Dialyse gegen verdünnte Salzlösungen mit kleineren Mengen von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (zu V)

Die Dialysen wurden in Kollodiumhülsen (Sartorius Membranfilter) durchgeführt. Es wurden etwa 0.1 bis 1.0 mg Protein eingesetzt. Die Proteinlösung wurde mit Dialysenflüssigkeit, die mit Diäthylpyrocarbonat gesättigt war, auf 0.25 ml verdünnt.

Dialysiert wurde gegen 500 ml einer Lösung, die durch Zusatz von 0.02-0.04% Diäthylpyrocarbonat sterilisiert wurde (42). Es wurde zunächst bei Raumtemperatur etwa 2-3 Stunden im Abzug dialysiert, bis sich das Diäthylpyrocarbonat aufgelöst hatte. Dann wurde die Dialyse bei 4° fortgeführt. Die Dialysenflüssigkeit wurde einmal, meist nach einem Tag, gewechselt.

Nach beendeter Dialyse wurden die Enzymproben mit dem Mikroskop auf Bakterien untersucht.

Durch die Behandlung mit Diäthylpyrocarbonat verliert das Enzym seine Aktivität.

16. Spaltung größerer Mengen von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase durch Membranfiltration mit verdünnten Alkali-Salzlösungen (zu V)

Die Membranfiltration muß unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden. Dazu wurde die in Abb. 46 gezeigte Apparatur verwendet. Das 4-Ltr.-Vorratsgefäß, gefüllt mit der Salzlösung und das Filtriergefäß mit einem PM-10-Filter (Diaflow) wurden 45 Minuten bei 1.2-1.3 atü sterilisiert. Das Schlauchsystem wurde mehrere Tage in 70% Äthanol gelagert. Das Enzym wurde mit einer Spritze durch ein sterilisiertes Membranfilter (Sartorius, 0.15 μ Porenweite) mit Glasfaservorfilter, gedrückt.

Die Salzlösung im Vorratsgefäß wird unter Druck ins Filtriergefäß befördert, wobei nach kurzer Zeit soviel Flüssigkeit nachströmt, wie durch das Filter abläuft. Es stellt sich dabei ein Stationärvolumen ein.

Das Volumen im Filtriergefäß läßt sich beliebig vermindern, wenn man den Verteiler umschaltet und damit das Vorratsgefäß umgeht.

Der notwendige Druck wurde mit einer Stickstoff-Flasche mit Reduzierventil erzeugt. Daran wurde ein Schlauchstück mit etwa 5 cm steriler Watte angeschlossen.

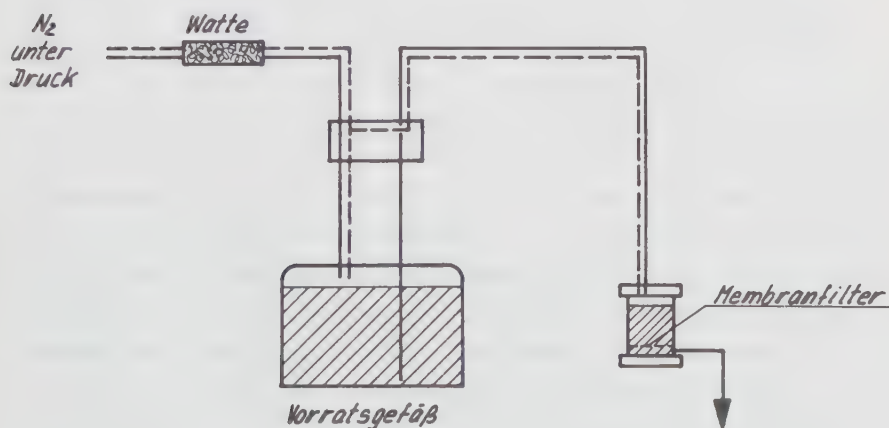


Abb. 46 Anordnung zur Membranfiltration

17. Durchführung der Disk-Elektrophorese (zu V)

Die Disk-Elektrophorese wurde mit der in Abb. 47 dargestellten Apparatur durchgeführt. Die übereinander angeordneten Elektrodentröge sind mit Glasröhrchen von 6 mm Innendurchmesser und 10 cm Länge verbunden, die mit je 2 ml Polyacrylamidgel gefüllt sind. Das Gemisch sämtlicher Komponenten außer Ammoniumperoxodisulfat wurde im Vakuum entlüftet. Die Röhrchen wurden während der Elektrophorese mit einem Ventilator gekühlt.

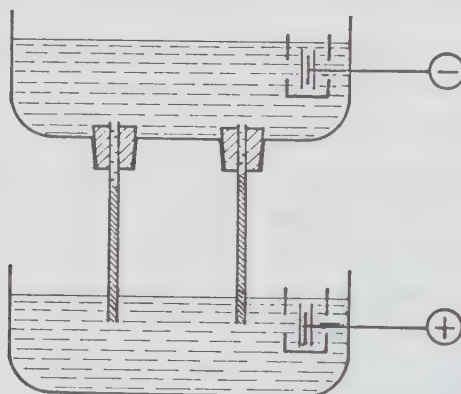


Abb. 47 Anordnung zur Disk-Elektrophorese

a) Disk-Elektrophorese in Natrium-Dodecylsulfat-Lösung

Die Elektrophoresen wurden nach der Methode von Weber und Osborn (33) durchgeführt, die auf die Arbeiten von Shapiro, Viñuela und Maizel (34) zurückgeht. 0.1-60 μg Protein wurden in 0.2% Na-Dodecylsulfat-Lösung 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann zusammen mit einem halben Tropfen Glycerin und 3 μl einer 0.5proz. Lösung von Bromphenolblau aufgesetzt. Das aufgesetzte Volumen lag unter 0.1 ml. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

b) Disk-Elektrophorese ohne Natrium-Dodecylsulfat

Es wurden auch hier 0.1-60 μg Protein und ein halber Tropfen Glycerin in weniger als 0.1 ml aufgesetzt. Bei unten angelegter Anode diente Bromphenolblau als Markierungsfarbstoff. Die Elektrophoresen wurden bei 3-5° durchgeführt und ebenfalls mit dem Ventilator gekühlt.

c) Färben und Entfärben der Gele

Die Gele wurden mit einer Lösung von 1.25 g Coomassie Brilliantblau G in einem Gemisch von 454 ml 50 % Methanol und 46 ml Eisessig über Nacht angefärbt (32). Sie wurden in einer Lösung von 75 ml Eisessig und 200 ml Methanol in 800 ml Wasser entfärbt (90).

d) Bestimmung der Radioaktivität im Gel

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurde das entfärbte Gel in Scheiben geschnitten und mit H_2O_2 radikalisch depolymerisiert (32). Die Gelscheiben wurden dabei zunächst zermahlen. Pro Millimeter Gellänge wurden 0.1 ml 30 % H_2O_2 zugesetzt. Der Ansatz wurde solange im siedenden Wasserbad gehalten, bis sich das Gel aufgelöst hatte, was je nach Art des Gels zwischen 10 und 45 Minuten dauerte. Die Lösungen wurden auf einer der eingesetzten Menge an Gel proportionalen Fläche Whatman 1-Papier ausgestrichen und im Scintillationszähler gemessen. Es wurde bis zu etwa 30% der eingesetzten Radioaktivität wiedergefunden.

18. Durchführung der Reassoziierung der Untereinheiten zur aktiven β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (zu V)

0.7 bis 1.5 mg Enzym in einer Lösung von etwa 0.2-0.3 ml wurden durch ein Filter von 0.15μ Porenweite in eine Kollodiumhülse gedrückt und dann im Exsiccator unter Stickstoff gegen 400 ml einer Lösung von 10 mM Cystein in 10 mM Glycin/NaOH-Puffer pH 9.8 bei 4°C dialysiert. Der Exsiccator wurde dazu zweimal mit der Wasserstrahlpumpe evakuiert und anschließend jeweils mit Stickstoff gefüllt. Nach einem Tag wurde die Dialysenflüssigkeit gewechselt. Die Dialyse wurde dann noch 1-2 Tage weitergeführt. Zur Kontrolle der Spaltung wurde ein Gradientenlauf mit dem SW-40-Ti Rotor durchgeführt. Der Gradient wurde unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen aufgebaut. Die Saccharoselösungen in 30 mM Cystein in 10 mM Glycin/NaOH Puffer pH 9.8 wurden mit Varsol, einer zwischen 150 und 160° siedenden Erdölfraction überschichtet. In das Zentrifugenröhrchen wurden in der üblichen Weise zunächst 1.5 ml 50proz. Saccharose-Lösung vorgelegt, die in einer Höhe von etwa 2 mm mit Varsol überschichtet war. Die Komponenten des 5-20proz. Saccharosegradienten wurden unter einer etwa 4 mm hohen Varsolschicht gemischt. Der Gradient wurde mit steigendem spezifischem Ge-

wicht durch ein Kapillarrohr auf die Grenzschicht der 50proz. Saccharose-Lösung geschichtet. Nach vollendetem Aufbau des Gradienten wurde die Varsolschicht mit 0.3 ml Cystein-haltigem Puffer unterschichtet. Der Spaltansatz in 2.5proz. Saccharose-Lösung wurde zwischen Puffer und Gradient geschichtet. Damit wurde eine direkte Berührung des Proteins mit der Varsol-Grenzschicht vermieden.

Um nach vollendetem Gradientenlauf die austropfenden Fraktionen vor Oxydation zu schützen, wurden in die Fraktionsgläser je 0.3 ml 30 mM Cystein in 50 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 6.3 vorgelegt. In den Fraktionen ergab sich damit ein pH-Wert von 7.5. Bei diesem pH-Wert sind -SH-Gruppen wesentlich weniger oxydationsempfindlich. Im Laufe einiger Stunden reassoziieren die Untereinheiten bei 4°C teilweise zum aktiven Enzym.

19. Elektrophoresen in der Michl-Elektrophorese-Apparatur (zu VI)

Abb. 48 zeigt schematisch den Aufbau der Apparatur. Als Träger der Elektrophorese dient Papier, das über ein Gestell gespannt und mit einem geeigneten Puffer besprüht wird. Die herabhängenden Enden des Papierbogens tauchen in die Elektroden-Tröge, die mit dem gleichen Puffer gefüllt sind. Das ganze Gestell steht in einem Trog, der zur Kühlung mit Varsol, einer bei 150 bis 160° siedenden Erdölfraction gefüllt ist. In den oberen Teil des Varsols tauchen Kühlschlangen, die an das Leitungswasser angeschlossen sind. Enthält der Puffer Pyridin, so muß dem Varsol eine bestimmte Menge Pyridin zugesetzt werden, da sich anderenfalls der pH-Wert des Puffers verschieben würde. An die Elektroden kann eine Spannung bis zu 6 000 V angelegt werden, jedoch soll pro Quadratcentimeter nicht mehr als 0.3 Watt verbraucht werden.

Der Papierbogen wurde von beiden Enden her mit dem Puffer besprüht, so daß sich die beiden Flüssigkeitsfronten auf der Auftragungslinie trafen. Die Startbande wird damit verschärft.

20. Messung der Radioaktivitätsverteilung mit dem Streifenzähler (zu VI)

Zur Aufnahme der Radioaktivitätsverteilung wurde der Streifenzähler der Firma Frieseke und Höpfner verwendet. Dabei wird ein Papierstreifen bis zu 3 cm Breite mit einer Geschwindigkeit von 12 cm/Stunde zwischen zwei Blenden von 0.5 oder 1.0 cm Breite hindurchgezogen. Beiderseits hinter den Blenden befinden sich Geigerzähler. Die Verteilung der Radioaktivität wird synchron von einem Schreiber aufgezeichnet.

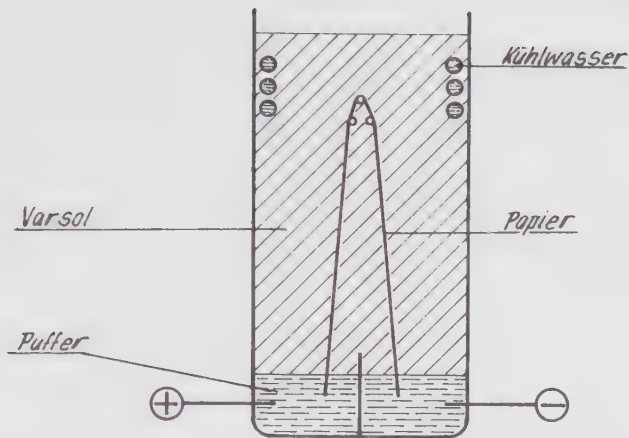


Abb. 48 Michl-Elektrophorese-Apparatur

21. Halbstündige Spaltung von β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase mit Pepsin (zu VI)

Eine Lösung von 35 mg Protein wurde mit 0.17 ml Äthylenimin versetzt und 2 $\frac{1}{2}$ Stdn. stehen gelassen. Zur Fällung des Proteins wurde die Lösung 10 Minuten bei 80-90° gehalten. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, der Überstand abgegossen. Nun wurden 6-7 ml Wasser zugegeben und der Niederschlag fein verteilt auf 90° erwärmt und abzentrifugiert. Die Operation wurde noch zweimal wiederholt. Der schließlich abzentrifugierte Niederschlag wurde in 1.5 ml Ameisensäure aufgelöst, in eine Pipette aufgenommen und in 20 ml Wasser eingerührt; dabei fiel kein Protein aus. Mit 0.5 ml Ameisensäure wurde nachgespült.

Zu dieser Lösung wurden 1.05 mg Pepsin (3 Gew.% bezogen auf das eingesetzte Protein) gegeben (91). Nach halbstündigem Verdauen (85) bei Zimmertemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml Pyridin unterbrochen und das Gemisch eingefroren.

Das Verdauungsgemisch wurde gefriergetrocknet und der Rückstand in 0.8 ml Pyridin/Acetat-Puffer pH 6.5 (10 : 0.4 : 90) aufgenommen; dabei blieb ein Teil ungelöst, der jedoch keine Radioaktivität enthielt.

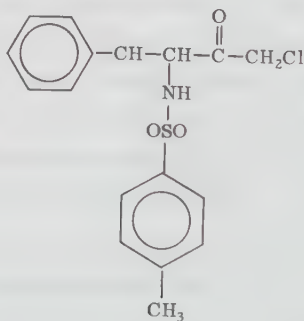
22. Überführung von Biotin und Biotinpeptiden in das Sulfoniumsalz (zu VI)

Die Reaktion wurde auf einem Whatman 1-Papierstreifen durchgeführt, der auf Parafilm lag. 0.1 oder 0.2 μMol aufgetragenes radioaktives Biotin wurde reichlich mit 0.2 M Jodacetamid-Lösung in Pyridin/Acetat-Puffer pH 3.5 (1:10:90) besprüht. Die Ausbeute hängt entscheidend von der aufgespritzten Menge ab. Die Papieroberfläche soll fast "schwimmen". Der Papierstreifen wurde bei 25 oder 30° in gesättigter Atmosphäre aufbewahrt. Maximale Ausbeute — in den besten Fällen 70-80% Sulfoniumsalz — erhält man nach etwa zwei Tagen.

Die Umsetzung von Biotinpeptiden zum Sulfoniumsalz wurde in gleicher Weise durchgeführt.

23. Spaltung des Sulfoniumsalzes des Biotinpeptids der halbstündigen peptischen Spaltung mit Trypsin (zu VI)

Das eingesetzte Trypsin wurde mit 1 (1-Tosylamido-2-phenyl)-äthyl-chloromethylketon (TPCK) (92) von chymotryptischer Begleitaktivität befreit. TPCK inaktiviert Cymotrypsin irreversibel.



Zum Trypsin, gelöst in 0.01 M Lösung von CaCl_2 in 0.01 M Tris/HCl-Puffer pH 7.2, wurde $\frac{1}{4}$ des Gewichtes an TPCK, gelöst in möglichst wenig Methanol gegeben. Dabei entsteht eine milchige Trübung durch ungelöstes TPCK. Nach etwa 4-5 Stunden Reaktionszeit bei Zimmertemperatur wurde das Trypsin zur Spaltung eingesetzt.

Der Sulfoniumsalzgipfel wurde mit 2.5 ml 5 mM Tris/HCl-Puffer pH 8.0 vom Whatman 1-Papierstreifen eluiert. Dem eingeeengten Eluat wurden 0.016 mg mit TPCK vorbe-

handeltes Trypsin in Lösung zugesetzt. Mit Tris/HCl-Puffer wurde der pH-Wert auf 8,0 eingestellt. Das Verdauungsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Reaktion wurde durch Einfrieren abgebrochen, die Lösung durch Gefrier-trocknen eingengt und auf einem 3 cm breiten Whatman-1-Papierstreifen zur Elektro-phorese aufgetragen.

Zusammenfassung

Im Rohextrakt von *Achromobacter* IVS finden sich zwei Biotin-Proteine, wenn das Zuchtmedium Isovaleriansäure als einzige Kohlenstoffquelle enthält. Durch eine Verbesserung der Züchtungsbedingungen ließen sich relativ leicht größere Mengen solcher Bakterien gewinnen.

Neben β -Methylcrotonyl CoA-Carboxylase, deren Anreicherung bereits bekannt war, wurde ein Biotin-Carboxylcarrier-Protein vom Molekulargewicht um 10 000 isoliert. Disk-Elektrophoresen des Proteins in drei verschiedenen Gelsystemen zeigten keine Begleitbanden mehr. Wie die bereits bekannten Biotin-Carboxylcarrier-Proteine aus *Propionibacterium* und *E. coli* ist es ein saures Protein. Sein isoelektrischer Punkt liegt bei pH 4.45. Es scheint eine sehr stabile Konformation zu besitzen, da es in Gegenwart von Natrium-Dodecylsulfat bei Raumtemperatur nicht aufgefaltet wird.

Die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase wurde nach verschiedenen Methoden in Untereinheiten zerlegt. Es zeigte sich, daß das Enzym aus zwei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut ist, einer Biotin-haltigen vom Molekulargewicht um 96 000 und einer ohne Biotin vom Molekulargewicht um 78 000. Diese Untereinheiten ließen sich nicht in kleinere Untereinheiten zerlegen. Nimmt man an, daß der Komplex entsprechend der Zahl von vier Biotin-Molekülen pro Enzym (13) aus je vier der beiden Untereinheiten aufgebaut ist, so ergäbe sich ein Molekulargewicht von etwa 700 000. Dies stimmt mit dem, mit der analytischen Ultrazentrifuge bestimmten, Wert von 760 000 (36) recht gut überein. Die Untereinheiten ließen sich teilweise zum aktiven Enzym reassoziieren, wenn man die Spaltung unter Stickstoff in Gegenwart von -SH-Verbindungen durchführte.

Im Verlauf der Spaltung lassen sich, im Gegensatz zu entsprechenden Biotin-Enzymen aus Eukaryonten, keine aus je einem der beiden Teilenzyme bestehenden "Unterkomplexe" feststellen. Anders als in Methylmalonyl-CoA-Pyruvat-Transcarboxylase aus *Propionibacterium* wurde in der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase aber auch kein Biotin-Carboxylcarrier-Protein gefunden. Das Biotin ist Bestandteil der Biotin-Carboxylase-Untereinheit. Die β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase aus *Achromobacter* dürfte damit eine Zwischenstellung in der Entwicklung der Biotin-Enzyme einnehmen.

Das isolierte Biotin-Carboxylcarrier-Protein ist wahrscheinlich Bestandteil der Acetyl-CoA-Carboxylase. Unter den Bedingungen der Anreicherung liegt es in freier Form vor, kann also nur schwach an die beiden Teilenzyme gebunden sein.

Unsere Untersuchungen zeigen damit, daß im gleichen Organismus, selbst innerhalb der gleichen Enzymfamilie, Enzyme verschiedener Entwicklungsstufen vorkommen können.

Zum weiteren Vergleich der Biotinenzyme versuchten wir die Aminosäuresequenzen ihrer Biotin-Peptide zu vergleichen. Wir übertrugen deshalb die Methode zur selektiven Anreicherung von Methionin-Peptiden von Tang und Hartley auf Biotin-Peptide. Die Methode macht sich die Eigenschaften von Thioäthern zunutze: Nach einer Elektrophorese werden die Peptide mit Jodacetamid umgesetzt; die dabei gebildeten Methionin- bzw. Biotinsulfoniumsalze lassen sich wegen der zusätzlichen positiven Ladung in einer weiteren Elektrophorese von den Begleitproteinen abtrennen. Biotin-Peptide aus β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase ließen sich zu 60-70% in das Sulfoniumsalz überführen.

Am Beispiel der β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase wurde gezeigt, daß Isolierungen von einzelnen Peptiden aus einer großen Zahl von Begleitpeptiden sich wesentlich vereinfachen lassen, wenn man die proteolytische Spaltung stufenweise durchführt und einer Teilspaltung ein bis zwei Reinigungsschritte folgen läßt. Die gleiche Reinigungsmethode läßt sich dabei wiederholt anwenden.

Literaturverzeichnis

- 1) Moss, Lane Adv. in Enzymology Vol. 35, 321 (1971)
- 2) Knappe Annual Review of Biochemistry 39, 757 (1970)
- 3) Brenda, Gerwin, Jacobson, Wood H.G.
Proc.Nat.Acad.Sci.US.Vol. 64, 1315 (1969)
- 4) Alberts, Nervi, Vagelos, Proc.Nat.Acad.Sci.US.Vol. 63, 1319 (1969)
- 5) Fall, Nervi, Alberts, Vagelos, Proc.Nat.Sci.US. Vol. 68, 1512 (1971)
- 6) Fall, Alberts, Fed.Proc. 30, 1058 (1971)
- 7) Fall, Vagelos, J.Biol.Chem. 247 (24) 8005 (1972)
- 8) Prescott, Vagelos, Adv.Enzym. 36, 269 (1972)
- 9) Lynen, Knappe, Lorch, Jütting, Ringelmann, Angew.Chem. 71, 481 (1959)
- 10) Knappe, Schlegel, Lynen, Biochem.Z. 335, 101 (1961)
- 11) Lynen, Knappe, Lorch, Jütting, Ringelmann, Lachance Biochem. Z. 335, 123 (1961)
- 12) Knappe, Ringelmann, Lynen, Biochem.Z. 335, 168 (1961)
- 13) Himes, Young, Ringelmann, Lynen, Biochem.Z. 337, 48 (1963)
- 14) Lane, Lynen, Proc.Nat.Acad.Sci.US. 49, 379 (1963)
- 15) Knappe, Biederbick, Brümmer, Angew.Chem. 74, 432 (1962)
- 16) Knappe, Wenger, Wiegand, Biochem.Z. 337, 232 (1963)
- 17) Wood H.G., Lochmüller, Riepertinger, Lynen, Biochem.Z. 337, 247 (1963)
- 18) Numa, Ringelmann, Lynen, Biochem.Z. 340, 228 (1964)
- 19) Numa, Bortz, Lynen, Advan. Enzyme Regulation 3, 407 (1965)
- 20) Hallmann, Bakteriologische Nährböden, Thieme Verlag, Stuttgart 1953, S. 70
- 21) K. Rehn, persönliche Mitteilung
- 22) Merckenschlager, Schlossmann, Kurz, Biochem.Z. 329, 332 (1957)
- 23) Jauch, Lynen, unveröffentlichte Ergebnisse
- 24) Vesterberg, Act.Ch.Sc. 23, 2653 (1969)
- 25) Bedienungsanleitung LKB-Produkte AB
- 26) Martin, Ames, J.Biol.Chem. 236, 1372 (1961)
- 27) Ifft, Analytical Methods of Protein Chemistry Vol. 5, 151 (1969)
- 28) Stark, Methods in Enzymology Vol. 11, 590
- 29) Stark, Methods in Enzymology Vol. 11, 125
- 30) Green, Methods in Enzymology Vol. 18 part A, 414, 418
- 31) Ru-Dong Wei, Methods in Enzymology Vol. 18 part A, 424

- 32) Maurer, Disk-Elektrophorese, Walter de Gruyter u. Co. Berlin 1968
- 33) Weber, Osborn, J.Biol.Chem. 244, 4406 (1969)
- 34) Shapiro, Viñuela, Maizel, Biochem.Biophys.Res.Comm. 28, 815 (1967)
- 35) P. Dimroth, persönliche Mitteilung
- 36) Apitz-Castro, Rehn, Lynen, Eur.J.Biochem. 16, 71 (1970)
- 37) Wieland T., Duesberg, Determann, Biochem.Z. 337, 303 (1963)
- 38) Cleland, Biochemistry 3, 480 (1964)
- 39) Cole, Methods in Enzymology, 11, 315 (1967)
- 40) Raftery, Cole Biochem.Biophys.Res.Comm. 10, 467 (1963)
- 41) Bestian, Liebigs Annalen 566, 227 (1950)
- 42) Schlegel, Allgemeine Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1969
- 43) Gottlieb, J.Bacteriol. 92, 1021 (1966)
- 44) Gottlieb, Annual Review of Microbiology 25, 111 (1971)
- 45) Nakanishi, Numa Eur.J.Biochem. 16, 161 (1970)
- 46) Kleinschmidt, Moss, Lane, Science 166, 1276 (1969)
- 47) Gregolin, Ryder, Kleinschmidt, Warner, Lane, Proc. Nat.Acad.Sci.US. 56, 148 (1966)
- 48) Numa, Ringelmann, Riedel, Biochem.Biophys.Res.Comm. 24, 750 (1966)
- 49) Vagelos, Alberts, Martin, J.Biol.Chem. 238, 533 (1963)
- 50) Matsuhashi M., Matsuhashi S., Lynen, Biochem. 11, 3779 (1972)
- 51) Inoue, Lowenstein, J.Biol.Chem. 247, 4825 (1972)
- 52) Moss, Yamagishi, Kleinschmidt, Lane, Biochem. 11, 3779 (1972)
- 53) Heinsteins, Stumpf, J.Biol.Chem. 244, 5374 (1969)
- 54) Kamangara, Stumpf, Arch.Bioch.Biophys. 152, 83 (1972)
- 55) Kaziro, Ochoa, Warner, Chen, J.Biol.Chem. 236, 1917 (1961)
- 56) Hegre, Lane, Biochim.Biophys. Acta 128, 172 (1966)
- 57) Halenz, Teng, Hegre, Lane, J.Biol.Chem. 237, 2140 (1962)
- 58) Scrutton, Utter, Mildvan, J.Biol.Chem. 241, 3480 (1966)
- 59) Young, Tolbert, Valentine, Wallace, Utter, Fed.Proc. 27, 522 (1968)
- 60) Utter, Scrutton, Current Topics in Cellular Regulation Vol. 1 Acad. Press New York 1969, p. 253
- 61) Valentine, Wrigley, Scrutton, Irias, Utter, Biochemistry 5, 3111 (1966)
- 62) Scrutton, Utter, J.Biol.Chem. 240, 1 (1965)
- 63) Irias, Olmsted, Utter, Biochemistry 8, 5136 (1969)
- 64) Sumper, Riepertinger, Eur.J.Bioch. 29, 237 (1972)

- 65) Mc Clure, Lardy, Kneifel, J.Biol.Chem. 246, 3569 (1971)
- 66) Cazzulo, Sundaram, Dilks, Kornberg H.L., Bioch.J. 122, 653 (1970)
- 67) Roon, Levenberg, J.Biol.Chem. 245, 4593 (1970)
- 68) Jacobson, Gerwin, Ahmad, Waegell, Wood H.G., J.Biol.Chem. 245, 6471 (1970)
- 69) Ahmad, Jacobson, Wood H.G., J.Biol.Chem. 245, 6486 (1970)
- 70) Green, Valentine, Wrigley, Ahmad, Jacobson, Wood H.G., J.Biol.Chem. 247, 6284 (1972)
- 71) Ahmad, Lygre, Jacobson, Wood H.G., J.Biol.Chem. 247, 6299 (1972)
- 72) Nervi, Alberts, Fed.Proc. 29 A 333 (1970)
- 73) Dimroth, Guchait, Stoll, Proc.Nat.Acad.Sci. (US) 67, 1315 (1970)
- 74) Guchait, Moss, Sokolski, Lane, Proc.Nat.Acad.Sci. (US) 68, 653 (1971)
- 75) Dimroth, Guchait, Lane, Hoppe Seyler Z.Physiol.Chem. 352, 351 (1971)
- 76) Nervi, Alberts, Vagelos, Arch.Bioch. 143, 401 (1971)
- 77) Alberts, Gordon, Vagelos, Proc.Nat.Acad.Sci. (US) 68, 1259 (1971)
- 78) Guchait, Sokolski, Moss, Polakis, Lane, Fed.Proc. 30, 1080 (1971)
- 79) Rominger, Dissertation Universität München 1964
- 80) Mc Allister, Coon, J.Biol.Chem. 241, 2855 (1966)
- 81) Tang, Hartley, Biochem.J. 102, 593 (1967)
- 82) Cotton, Harris, J.Phys.Chem. 59, 1205 (1955)
- 83) Houben Weyl, Methoden der Organischen Chemie 9, S. 177
- 84) Das Peptidgemisch wurde freundlicherweise von K. Rehn zur Verfügung gestellt.
- 85) Braunitzer, Hilschmann, Müller, Hoppe Seyler's Z. Physiol.Chem. 318, 284 (1960)
- 86) W. Hauf, persönliche Mitteilung
- 87) Warburg, Christian, Biochem.Z. 310, 384 (1942)
- 88) Simon, Shemin, J.Amer.Chem.Soc. 75, 2520 (1953)
- 89) Heppel, Methods in Enzymology Vol. 1, 572
- 90) M. Sumper, persönliche Mitteilung
- 91) Leggett Bailey, Techniques in Protein Chemistry Elsevier Publishing Company Amsterdam-London-New York 1962
- 92) Kotha, Carpenter, J.Biol.Chem. 239, 1799 (1964)

Lebenslauf

Ich wurde am 22.7.1940 in Rathenow geboren. Mein Vater war Franz Schiele, Diplom-Ingenieur; meine Mutter ist Pia Schiele, geb. Stark. Von 1947 bis 1949 besuchte ich die Volksschule in Premnitz (Westhavelland), dann in Obernburg am Main. 1951 trat ich in die Oberrealschule Aschaffenburg ein. 1959 wechselte ich in die Oberrealschule Miltenberg/Main über und legte dort 1960 das Abitur ab. Im Wintersemester 1960 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Universität München. Im Sommersemester 1963 legte ich dort das Vordiplom, im Sommersemester 1966 das Hauptdiplom ab. Unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Lynen führte ich von März 1967 bis März 1973 die vorliegende Diplom- und Doktorarbeit aus.

